

# La Universidad

Órgano científico-sociocultural de la Universidad de El Salvador

Segunda Época    Publicación trimestral

N° 3 y 4, julio - diciembre de 2022







## **UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

### **EDITORIAL UNIVERSITARIA**

#### **Misión**

Editar e imprimir libros, revistas, resultados de investigación, obras de autores nacionales y extranjeros relacionados con la enseñanza universitaria y cultura general, que coadyuven al desarrollo óptimo de planes y programas de estudio de la Universidad de El Salvador así como al desarrollo cultural del país. Asimismo ser un apoyo para la impresión de papelería, afiches, encuadernación de libros e impresión de títulos y diplomas que la Universidad de El Salvador confiere.

#### **Visión**

Posicionarse como el principal referente nacional y regional en materia editorial y de impresión, tanto en la calidad de contenidos como en la calidad de material impreso.

Para colaboraciones:

Editorial Universitaria, Universidad de El Salvador. Final Av. «Mártires Estudiantes del 30 de julio». Ciudad Universitaria «Dr. Fabio Castillo Figueroa»  
[editorial.universitaria@ues.edu.sv](mailto:editorial.universitaria@ues.edu.sv)

**ISSN 0041-8242**

## Autoridades universitarias

MSc. Roger Armando Arias Alvarado  
**Rector**

Dr. Raúl Ernesto Azcúnaga López  
**Vicerrector Académico**

Ing. Juan Rosa Quintanilla Quintanilla  
**Vicerrector Administrativo**

Ing. Francisco Antonio Alarcón Sandoval  
**Secretario General**

M.V.Z. María José Vargas Artiga  
**Presidenta de la Asamblea General  
Universitaria**

Lic. Rafael Humberto Peña Marín  
**Fiscal General**

Lic. Luis Antonio Mejía Lipe  
**Defensor de los Derechos  
Universitarios**

Msc. Josefina Sibrián de Rodríguez  
**Decana de Facultad de Medicina**

Dr. Saúl Díaz Peña  
**Vicedecano de Facultad de Medicina**

## Revista *La Universidad*

### **Director:**

Dr. Raúl Ernesto Azcúnaga López

### **Diseño:**

Ángel Iván Yash Nuñez

### **Correctora de texto:**

Alba Isabel Landaverde Granadino

## Universidad de El Salvador



---

## Consejo Editorial

Dr. Raúl Ernesto Azcúnaga López  
Universidad de El Salvador,  
El Salvador

MSc. Ana Silvia Ortiz  
Universidad de El Salvador,  
El Salvador

Dr. Carlos Gregorio López Bernal  
Universidad de El Salvador,  
El Salvador

† Dr. Hugo de Burgos  
Universidad de British Columbia,  
Canadá

Dra. Tania Pleitez Vela  
Universidad Autónoma de Barcelona,  
España

Dr. Alexander Sánchez Mora  
Universidad de Costa Rica,  
Costa Rica

Dra. Alexandra Ortíz Wallner  
Universidad Humboldt de Berlín,  
Alemania

Dr. José Luis Ramírez Luengo  
Universidad Complutense de Madrid,  
España



# La Universidad

Órgano científico-sociocultural de la Universidad de El Salvador

Segunda Época

Publicación trimestral

N.º 3 y 4, julio - diciembre de 2022

## Contenido

**Carta del director ..... 1**

**Prólogo ..... 3**

**Capítulo 1. Oncología pediátrica..... 7**

Paediatric relapsed acute leukaemia: curative intent chemotherapy improves quality of life..... 9

The Cost and Cost-Effectiveness of Childhood Cancer Treatment in El Salvador, Central America: A Report From the Childhood Cancer 2030 Network ..... 27

Community resources support adherence to treatment for childhood cancer in El Salvador..... 46

Anaplastic Large Cell Lymphoma in Central America: A Report From the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA) ..... 68

Interventions Targeting Absences Increase Adherence and Reduce Abandonment of Childhood Cancer Treatment in El Salvador. 87

Low Socioeconomic Status Is Associated with Prolonged Times to Assessment and Treatment, Sepsis and Infectious Death in Pediatric Fever in El Salvador ..... 106

Outcome of Children Treated for Relapsed AcuteLymphoblastic Leukemia in Central America .....	128
Pediatric Oncology Research in Low Income Countries: Ethical Concepts and Challenges .....	146
Psychological Referral and Consultation for Adolescents and Young Adults With Cancer Treated at Pediatric Oncology Unit.....	165
Late Relapse of Embryonal Rhabdomyosarcoma, Botryoid Variant, of the Vagina.....	177
<b>Capítulo 2. Patología pediátrica .....</b>	<b>183</b>
Multinational Retrospective Central Pathology Review of Neuroblastoma .....	185
Bridging the Gap in Access to Care for Children With CNS Tumors Worldwide.....	207
Improving Immunohistochemistry Capability for Pediatric Cancer Care in the Central American and Caribbean Region: A Report From the AHOPCA Pathology Working Group.....	213
¿Por qué y cómo mueren los niños con dengue? .....	231
Pericarditis aguda y taponamiento cardiaco por Haemophilus influenzae tipo IVb en una paciente pediátrica. Comunicación de un caso de autopsia, El Salvador.....	248
<b>Capítulo 3. Nutrición .....</b>	<b>263</b>
“Atol Shuco”, a Traditional Corn-Fermented Salvadorian Beverage: Phytochemical, Microbiological and Nutritional Considerations <sup>6</sup> .....	265

## **Capítulo 4. Educación Superior y Ciencias Sociales ..... 301**

Factores que influyen en la elección de una carrera en atención primaria entre los estudiantes de medicina en América Central .....303

Desarrollo de competencias investigativas en el pregrado. Aproximaciones teóricas .....331

Factores de riesgo y factores de protección asociados al ingreso, permanencia y abandono de jóvenes a la pandilla o mara. Vivencias e interpretaciones de sus actores.....349

Cooperación científica del claustro docente para guiar las investigaciones de la maestría en salud pública de la facultad de medicina .....366

Experiencia y percepción investigativa de los docentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador .....384

La cooperación científica para la asesoría de tesis del posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-LEÓN .....409

La legislación de la educación superior y la formación de profesionales en El Salvador.....430

Perfil epidemiológico de la drogadicción en estudiantes universitarios.....467

## **Capítulo 5. Factores de riesgo cardiovascular ..... 485**

Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, síndrome metabólico e hiperuricemia en personal docente y administrativo de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador en el año 2018.....487

**Capítulo 6. Micología .....505**

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* y su impacto en la salud .....507

**Capítulo 7. Genómica viral .....527**

Primeras seis secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 por NGS en El Salvador .....529

Análisis de la mutación D614G en secuencia del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador .....542

Muestra de saliva para diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en población ambulatoria.....557

Origen del perfil de mutaciones presente en las secuencias de SARS-CoV-2 en El Salvador .....576

**Capítulo 8. Biotecnología microbiana .....599**

Thermostability enhancement of the *Pseudomonas fluorescens* esterase I by in vivo folding selection in *Thermus thermophilus* ....601

**Listado de docentes investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador .....628**

**BIBLIOGRAFÍA.....630**

## Carta del director

La Universidad de El Salvador lanza un nuevo número de la Revista *La Universidad*. Estamos sabedores que una institución como la nuestra ve como elemento fundamental contar con un espacio de divulgación científica y cultural. Y es nuestra intención seguir con esa visión crítica y de debate académico.

Por las páginas de esta revista han corrido ríos de tinta de intelectuales que pensaban el presente y futuro, tanto de la universidad como de la nación. En consecuencia, los intelectuales, nuestros intelectuales universitarios han intervenido en las distintas problemáticas estructurales y superestructurales de nuestra realidad. En otras palabras, la revista ha servido como escenario para el debate de ideas de pensadores importantes de nuestro país que han abordado numerosas temáticas de la realidad nacional. Es decir, la universidad y nuestra revista ha sido un dispositivo discursivo valioso para el desarrollo de la visión científico y humanista de nuestra nación. La universidad ha sido un espacio de articulación de proyectos del debate académico.

Esta tarea no ha sido nada fácil, para ello ha sido necesario desarrollar toda una infraestructura intelectual sólida. En ese sentido, es innegable dar un giro hacia nuestro pasado reciente y ver como en nuestra *alma mater* estaba conformada por intelectuales comprometidos, éticos y científicos. Me refiero a la época de oro de nuestra universidad, la época de Jorge Arias Gómez, Alejandro Dagoberto Marroquín, Rafael Menjívar Larín, Matilde Elena López y por supuesto, la época del Dr. Fabio Castillo Figueroa.

Por ello, con la continuidad de la publicación de la Revista *La Universidad*, seguimos apostando a crear el espacio de discusión académica, científica y humanista de nuestros intelectuales nacionales y extranjeros. Porque como ya lo decía Francisco Gavidia «los pueblos necesitan ideas como los hombres necesitan y tienen alma» y nosotros tenemos que seguir explorando sobre el alma de nuestra

universidad, sobre el alma de nuestra nación. Así pues, sigamos desarrollando una infraestructura intelectual que cuestione y proponga desde una actitud científica, para producir un «bienestar material y espiritual» de la nación y de su población, tal y como nos planteó el Dr. Fabio Castillo Figueroa.

Dr. Raúl Ernesto Azcúnaga López

## Prólogo

Uno de los grandes objetivos de la docencia universitaria es la investigación científica y suele tenerse como premisa que los docentes de la Facultad de Medicina no investigan ni escriben artículos científicos, debido a ello es válido preguntarnos ¿cuál es la producción científica de los profesores de la Facultad de Medicina? y ¿qué líneas de investigación se están desarrollando por los profesionales sanitarios?

El presente esfuerzo de difusión ha sido realizado por la Unidad de Investigación Científica Académica de la Facultad de Medicina (UNICA-FM) en coordinación con la Vicerrectoría Académica de la Universidad de El Salvador, a través de la Editorial Universitaria. El objetivo es conocer parte de la producción científica de la Facultad de Medicina y divulgar entre la comunidad universitaria las publicaciones realizadas por los docentes de nuestra facultad. Los artículos que se presentan en el compendio fueron enviados de forma voluntaria por los investigadores, luego de abrir una convocatoria a todo el personal académico de la Facultad de Medicina para que presentarán publicaciones que estuvieran interesados en divulgar.

Una vez recibido el listado de publicaciones se procedió a descargarlas utilizando los recursos virtuales pagados por la Universidad de El Salvador, específicamente se utilizó Research4life, que es el nombre colectivo para los programas Hinari, AGORA, OARE, ARDI y GOALI, que brindan acceso libre o de bajo costo a contenido en línea revisado por pares académicos y profesionales en países en vías de desarrollo. Para cada documento del presente compendio se respeta el idioma original del artículo, los autores y la revista en la que fueron publicados.

Al final de la convocatoria se recibieron 31 artículos que cumplieron los requisitos para ser incluidos en el compendio, ya que cuentan con respaldo editorial previo (DOI o ISSN).

## **Capítulo 1. Oncología pediátrica**

Este capítulo contiene 10 publicaciones que cuya línea de trabajo es la oncología pediátrica que desarrolla el Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Niños Benjamín Bloom, los artículos se han trabajado en coordinación con otros hospitales pediátricos de Centro América, Argentina, República Dominicana, Canadá, Estados Unidos, Países Bajos e Italia.

## **Capítulo 2. Patología pediátrica**

Capítulo que incluye 5 artículos sobre patología pediátrica realizada en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Niños Benjamín Bloom, los artículos se han desarrollado en conjunto con los departamentos de patología de hospitales de Cuba, América del Sur, Asia y Estados Unidos.

## **Capítulo 3. Nutrición**

Capítulo en el que se incluye un artículo de publicación reciente sobre consideraciones nutricionales y microbiológicas del “Atol Shuco”, dicho trabajo fue desarrollado y publicado por un grupo de investigadores que incluyó docentes de la Carrera de Nutrición de la Facultad de Medicina, la Facultad de Química y Farmacia y de la Universidad de Illinois, Estados Unidos.

## **Capítulo 4. Educación superior y ciencias sociales**

En este capítulo se incluyen 7 publicaciones que abordan varios temas, incluyendo los factores que influyen en la elección de las diferentes especialidades médicas, desarrollo de competencias investigativas por parte de estudiantes de pregrado, la calidad de los trabajos de grado y de algunas maestrías, el uso de drogas recreativas por parte de los estudiantes universitarios, e incluso se abordan los factores asociados al ingreso, permanencia y abandono a las pandillas juveniles.



## **Capítulo 5. Factores de riesgo de enfermedades Crónico-Degenerativas**

Dicho capítulo describe los diferentes factores de riesgo cardiovascular, síndrome metabólico e hiperuricemia del personal docente y administrativo de la Facultad de Medicina.

## **Capítulo 6. Micología**

Capítulo que describe las características biológicas del hongo *Aspergillus* sp encontrada en las semillas de *Caesalpinia coriaria* (Nacascal) y su impacto en la salud.

## **Capítulo 7. Genómica viral**

En este capítulo se presentan 4 publicaciones, las primeras 3 describen la secuenciación del genoma completo del virus SARS-CoV-2 aislados de pacientes de diagnóstico de COVID-19. Dicha secuenciación, se realizó utilizando por primera vez en El Salvador tecnología de secuenciación masiva de próxima generación conocida como NGS adquirida recientemente por el Laboratorio de Virología y Biología Molecular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina en coordinación con el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. La cuarta publicación evalúa la autotoma de saliva y secreción nasofaríngea como muestra biológica para realizar diagnóstico por PCR en tiempo real de infección por el virus SARS-CoV-2.

## **Capítulo 8. Biotecnología microbiana**

En este capítulo se describe el proceso molecular por medio del cual se logró mejorar las características de una enzima de interés biotecnológico (Esterasa I de *Pseudomonas fluorescens*) utilizando de un microorganismo termófilo (*Thermus thermophilus*) como factoría para seleccionar las variantes termoestables de la enzima de interés.

Los 31 artículos del presente compendio son la evidencia más contundente que muchos de los docentes de la Facultad de Medi-

cina sí cumplen con el objetivo de realizar investigaciones y publicaciones científicas, dichos trabajos generan información relevante sobre la realidad nacional y por lo tanto, es de suma importancia su divulgación ante la comunidad universitaria, instando a los interesados para que profundicen en la lectura de la presente compilación y de estar interesados escribir al correo institucional de los investigadores para conocer más sobre la temática particular que les haya interesado y/o hacerse orientar de expertos investigadores en los respectivos temas estudio.

Dr. Noé Rigoberto Rivera  
Unidad de Investigación Científica Académica  
Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador

# Capítulo 1. Oncología pediátrica



# Paediatric relapsed acute leukaemia: curative intent chemotherapy improves quality of life

Carmen Salaverria<sup>1</sup>

Erin Plenert<sup>2</sup>

Roberto Vasquez<sup>1</sup>

Soad Fuentes-Alabi<sup>1</sup>

George A Tomlinson<sup>3</sup>

Lillian Sung<sup>4</sup>

<https://orcid.org/0000-0003-0951-3091>

<sup>1</sup>Division of Hematology and Oncology, Hospital Nacional De Niños Benjamín Bloom, San Salvador, El Salvador; <sup>2</sup>Child Health Evaluative Sciences, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; <sup>3</sup>Department of Medicine, Toronto General Hospital, Toronto, Ontario, Canada; <sup>4</sup>Division of Haematology/Oncology, Department of Paediatrics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada.

**To cite:** Salaverria C, Plenert E, Vasquez R, et al. BMJ Supportive & Palliative Care Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. Doi:10.1136/bmjspcare-2020-002722

## Correspondence to:

Dr. Lillian Sung, Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children Department of Paediatrics, Toronto M5G 1X8, Ontario, Canada; [lillian.sung@sickkids.ca](mailto:lillian.sung@sickkids.ca)

Received 2 October 2020

Revised 18 December 2020

Accepted 3 January 2021

## Abstract

**Objectives.** Paediatric patients with leukaemia with relapse or induction failure have poor prognosis. Anticipated quality of life (QoL) is important in treatment decision making. The objective was to determine if curative intent at relapse or induction failure, when compared with palliative intent, was associated with child's physical health, pain or general fatigue and parents' QoL over time among patients with paediatric leukaemia in El Salvador.

**Methods..** This was a prospective observational cohort study. Children 2–18 years with acute leukaemia at first relapse or induction failure were eligible. Assessments occurred every 2 months for up to 2 years using validated proxy report and self-report scales, where guardians were the primary respondents. Initial curative or palliative intent was categorised at enrolment by physicians. The impact of initial intent on QoL was assessed using linear mixed effects models and interaction between QoL and time.

**Results.** Of the 60 families enrolled, initial treatment intent was curative in 31 (51.7%) and palliative in 29 (48.3%). During the 2-year observation period, 44 children died. Initial curative intent significantly improved child's physical health (estimate=8.4, 95% CI 5.1 to 11.6), pain (estimate=5.4, 95% CI 1.5 to 9.2) and fatigue (estimate=6.6, 95% CI 3.2 to 9.9) compared with palliative intent, but not parents' QoL (estimate=1.0, 95% CI -0.8 to 2.8).

**Conclusions.** Among paediatric patients with acute leukaemia at relapse or induction failure, initial curative intent treatment plan was associated with better physical health, pain and fatigue when compared with palliative intent. A curative approach may be a reasonable option for patients with acute leukaemia even when prognosis is poor.

### Key messages

What was already known?

- Pediatric acute leukemia patients with relapse or induction failure living in low and middle income countries have a poor prognosis.
- Anticipated quality of life is central to therapeutic decision making when the prognosis is poor.

What are the new findings?

- Children treated with initial curative intent at relapse or induction failure had significantly better child physical health, less pain and less fatigue compared to those treated with initial palliative intent treatment plan.
- Parent quality of life was similar between those treated with initial curative vs. initial palliative intent therapy.

What is their significance?

- Initial curative intent therapy was associated with better child quality of life when compared with initial palliative intent therapy for pediatric patients with relapsed or induction failure acute leukemia.
- A curative approach may be a reasonable option for patients with acute leukemia even when the prognosis is poor.

## Introduction

Cancer outcomes for children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and acute myeloid leukaemia (AML) have improved in high-income countries (HIC), where 80%–90% and 50%–60% are expected to survive without recurrence, respectively.<sup>1</sup> When relapse occurs in this setting, up to 50% of children with ALL and 30% of children with AML can be cured, often with the use of haematopoietic stem cell transplantation or immunotherapies.<sup>2–10</sup> However, in low-income and middle-income countries (LMIC), survival for newly diagnosed and relapsed leukaemia is worse than in HIC.

In El Salvador, an LMIC, the 5-year event-free survival (EFS) was approximately 50% in ALL<sup>11</sup> and 24% in AML.<sup>12</sup> Survival following relapse was evaluated more broadly in a Central American cohort.

Following ALL relapse, the 3-year EFS was 22% and the 3-year overall survival (OS) was 28%. Following AML relapse, the 3-year EFS was 6% and the 3-year OS was 8%. For paediatric patients with cancer with poor prognosis, one of the most important therapeutic decisions is whether the intent of therapy should be curative or palliative.<sup>13</sup> Factors influencing this decision include anticipated quality of life (QoL), length of life remaining, impact on the family and costs.

Even though anticipated QoL is central to therapeutic decision making at the time of relapse, little is known about QoL for paediatric patients following relapse in either the HIC or LMIC setting. In a study conducted in Canada, physical health, pain and fatigue were particularly compromised in children and adolescents with cancer who had poor prognosis.<sup>13</sup> Having a child with cancer is also known

to impact on parents' QoL.<sup>14</sup> Estimates of child's or parents' QoL in those treated with curative versus palliative intent are particularly limited.

Consequently, the objective was to determine if curative intent at relapse or induction failure, when compared with palliative intent, was associated with child's physical health, pain or general fatigue and parents' QoL over time among paediatric patients with leukaemia in El Salvador.

## **Methods**

### **Design and setting**

This was a prospective observational cohort study. The setting was the Benjamin Bloom National Children's Hospital (Hospital Bloom) in San Salvador, El Salvador. Hospital Bloom, the only hospital in El Salvador that admits and treats children with cancer, cares for approximately 200 newly diagnosed children and adolescents with cancer each year. Treatment is provided at no cost to families; accommodation and child care are also offered free of charge to families living a long distance from the hospital to reduce abandonment of therapy. Funding for these programmes is provided by Fundación Ayúdame a Vivir (a local non-governmental organisation), the government and international partnerships.

### **Eligibility criteria**

Children with first relapse or induction failure of ALL or AML were eligible. Those between 2 and 18 years of age at relapse with a guardian who could understand Spanish were included. We excluded children who were severely ill at relapse (to an extent that it would not have been appropriate to approach the family for research as determined by the attending physician) and families who refused any treatment including supportive care.



## Procedures

The research coordinator approached eligible families in person to discuss the study. Guardians and children provided written informed consent and assent (if applicable) to participate. To cover transportation costs and food purchases, the family was provided a \$10 gift certificate with each completed assessment.

Enrolment had to occur within 1 month of first relapse or induction failure. At enrolment, intent of therapy was obtained from the patient's primary physician and was classified as curative versus palliative. Factors influencing intent of therapy included patient, cancer and relapse features as well as the family's preference. A prespecified algorithm for classification was not used. Guardians completed a baseline demographic survey.

In terms of QoL assessments, guardians were the primary respondents and, if possible, the same guardian reported QoL throughout the study. Children at least 5 years of age at enrolment were also invited to self-report their QoL if they could understand Spanish; their participation was optional. QoL assessments occurred at baseline and then every 2 months ( $\pm 2$  weeks). Assessments continued until withdrawal of consent or death, even in the event of subsequent relapse or abandonment of therapy, for a maximum of 2 years.

## Outcomes

The primary QoL domains of interest were paediatric patients' physical health, pain and fatigue and parents' overall QoL. Guardian proxy report and paediatric patient self-report (if applicable) were obtained for three instruments: PedsQL 4.0 Generic Core Scales, PedsQL 3.0 Acute Cancer Module and PedsQL Multidimensional Fatigue Scale. Guardians also completed the PedsQL Family Impact Module on behalf of themselves and their family.

The 23-item PedsQL 4.0 Generic Core Scales reflects four dimensions, namely physical, emotional, social and school functioning. Pae-

diatric patients' physical health was derived from this instrument. The 27-item PedsQL 3.0 Acute Cancer Module assesses the following eight dimensions: pain and hurt, nausea, procedural anxiety, treatment anxiety, worry, cognitive problems, perceived physical appearance and communication.<sup>15</sup> Paediatric patients' pain was derived from this instrument. The 18-item PedsQL Multidimensional Fatigue Scale assesses general, sleep/rest and cognitive fatigue. Paediatric patients' general fatigue was derived using this instrument. All three instruments are reliable and valid in healthy populations and in children with cancer.<sup>15-17</sup> The PedsQL Family Impact Module is a multidimensional parent-report scale that was designed to measure the impact of paediatric chronic health conditions on the parent and the family.<sup>18</sup> It measures parents' self-reported physical, emotional, social and cognitive functioning, communication and worry. It also measures parent-reported family daily activities and relationships. This measure is reliable and valid in families of children with chronic diseases.<sup>18</sup> Parents' overall QoL was derived using this instrument. For all instruments, scores were transformed on a scale ranging from 0 (worst health) to 100 (best health). To derive dimension and summary scores, more than half of the items had to be answered for that dimension. The Spanish version and a 1-month recall period were used.

All questionnaires were administered in person by the research coordinator, although if the family was not seen in clinic proximal to an assessment time point it could be obtained by telephone. Respondents were offered the ability to complete the forms on their own or have them read out loud by the research coordinator. Instruments were completed on paper and not electronically.

## **Analysis**

To compare baseline demographics between the curative intent and palliative intent groups, continuous variables were compared using Wilcoxon rank-sum test, while categorical variables were compared using

Fisher's exact test. In order to determine the impact of intent of therapy at relapse or induction failure on QoL, we fit linear mixed

effects models with random effects for subject and assessment time point, and described the estimate for the interaction term between intent and time point with its 95% CI. To identify potential confounders, we also evaluated the effect of child's age, sex, leukaemia relapse type (ALL relapse vs AML relapse, or induction failure with either ALL or AML), whether any guardian was unemployed, mother with less than high school education, father with less than high school education, family income less than \$2000 annually, and whether the palliative care team was consulted at initial relapse or induction failure. These factors were based on previous research<sup>19 20</sup> or clinical judgement.

To evaluate the potential for survivor bias, we also depicted the trajectory of physical health, pain, general fatigue and parents' QoL by initial intent of therapy for individual patients who died. We displayed the time points relative to the date of death (in other words months prior to death) and calculated the mean values by group. All analyses were performed using R Studio V.3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing).

## Results

Between January 2015 and May 2017, there were 95 potential participants identified; 60 were eligible and agreed to be enrolled. Figure 1 illustrates the flow diagram of patient identification, selection and reasons for exclusion. Out of 50 children eligible to self-report by age, there were 10 who agreed to self-report.

Among the 60 participating families, one moved to a different country and was lost to follow-up after completing the baseline assessment. An additional 44 children died during the 2-year observation period and thus 15 families completed all 12 assessment time points. Most proxy respondents were mothers (n=53); other respondent types were fathers (n=2), grandparents (n=3), aunt (n=1) and sibling (n=1). In terms of proxy report assessments, there were no missing assessment time points prior to death. For child self-report assessments, there were three children who missed only the fi-

nal assessment prior to death. Thus, the completion rate was 461 of 464 (99.4%) of the total possible number of assessment time points (proxy report and self-report combined).

All enrolled children received chemotherapy. At relapse or induction failure, initial treatment intent was categorised as curative in 31 (51.7%) and palliative in 29 (48.3%) by their attending physician. Online supplemental etable 1 describes the initial chemotherapy treatment plan at study enrolment. Table 1 describes the demographic characteristics of children, guardians and households for the entire cohort and stratified by initial intent of treatment.

The most common diagnosis was ALL relapse (48, 80.0%). The distribution of diagnoses was significantly different by intent of therapy, with more children with ALL relapse having initial curative intent compared with AML relapse or induction failure with ALL or AML ( $p=0.040$ ). The palliative care team was involved at relapse or induction failure in 39 (65.0%), with no significant difference by intent of therapy (table 1).

Those in the initial curative intent group had significantly longer time from initial diagnosis to enrolment compared with the initial palliative intent group (median 36 months (IQR 23–48) vs 14 months (IQR 4–19),  $p<0.001$ ). No other baseline feature was significantly associated with initial intent of therapy, including distance to the nearest hospital, distance to Hospital Bloom, or difficulty with and barriers to bringing the child to hospital (table 1). The number of mother respondents was similar in the curative intent group (26, 84%) and the palliative intent group (27, 93%;  $p=0.416$ ) when comparing proxy respondent type.

Online supplemental etable 2 illustrates the characteristics at death of the 44 patients who died during the 2-year study period after enrolment. Most had palliative care involvement in the preceding 1 month prior to death (35, 79.5%) and almost all received pain medication in the preceding 1 week prior to death (43, 97.7%). Table 2 shows the median guardian proxy-reported generic QoL,

cancer-specific QoL and fatigue, along with the number of participants remaining at baseline, 6 months, 12 months, 18 months and 24 months, while online supplemental etable 3 shows detailed QoL assessments at each time point obtained every 2 months.

**Figure 1.** *Participant recruitment flow diagram*

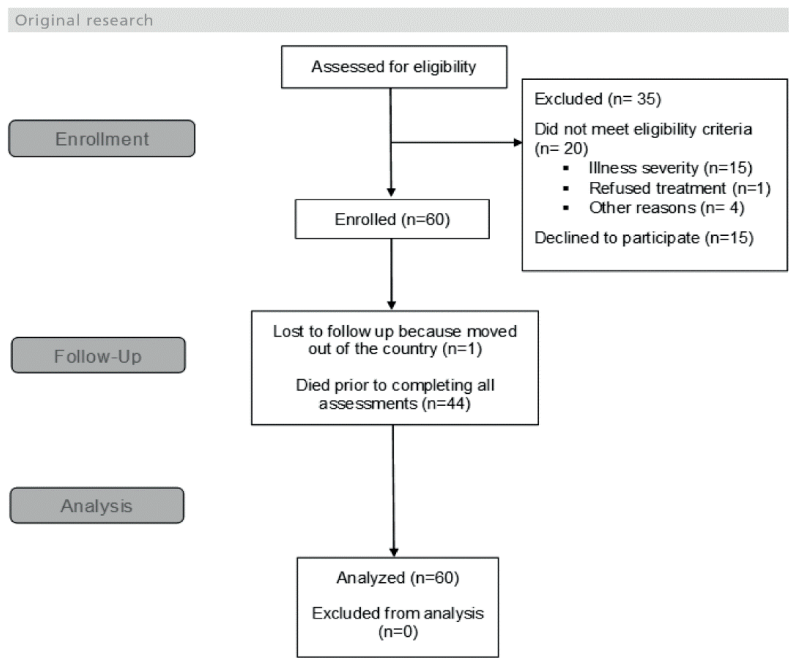


Table 3 shows how the baseline factors impacted change in QoL over time, and figure 2 shows the mean QoL assessments by intent of therapy. Initial curative intent of therapy significantly improved physical health, pain and fatigue over time.

For example, in terms of physical health, those in the curative intent group had on average an 8.4 increase in QoL per month when compared with the palliative intent group (95% CI 5.1 to 11.6). However, initial curative intent did not significantly impact on parent QoL. Table 3 also shows that no other covariate had a significant impact on change in QoL over time.

Online supplemental efigure 1 shows the individual trajectory of physical health, pain, general fatigue and parents' QoL in the curative intent (black line) versus the palliative intent (red line) groups among the 44 children who died. Although QoL was highly variable for individual children, the mean child physical health, pain and fatigue trajectories appeared relatively parallel in the curative intent versus the palliative intent groups.

## Discussion

In this prospective observational study of paediatric patients with acute leukaemia at relapse or induction failure in El Salvador, most children died during the 2-year study period. Those treated with initial curative intent at relapse or induction failure, when compared with those treated with initial palliative intent, had significantly better physical health, pain and fatigue over time. This association could not be explained by confounders or survivorship bias.

The association between initial curative intent and better QoL over time was statistically significant even though children treated with palliative intent did not survive beyond 10 months. One possibility is that children treated with a curative intent had better baseline status and better risk disease, thus confounding the association between intent and QoL. However, the graphical display of QoL suggests that baseline QoL was similar in the curative intent and palliative intent groups. A second possibility is that there is survivorship bias, where those with the worst QoL die and are disproportionately removed from the curative and palliative intent groups. However, the individual trajectories of individual patients suggest that QoL in the curative intent group was relatively preserved proximal to death. This finding has important implications since QoL is an important factor clinicians consider when making decisions about treatment in the poor prognosis setting.<sup>13 21</sup>

**Table 1.** *Demographics of the study cohort (N=60)*

Characteristics	Entire cohort (N=60)	Initial curative intent (n=31)	Initial palliative intent (n=29)	P value†
<b>Child characteristics</b>				
Male, n (%)	40 (67)	19 (61)	21 (72)	0.523
Median age in years at enrolment (range)	8 (3–15)	8 (6–11)	9 (5–12)	0.912
Diagnosis, n (%)				0.040
Relapsed ALL	48 (80)	29 (94)	19 (66)	
Relapsed AML	7 (12)	2 (6)	5 (17)	
Induction failure ALL	1 (27)	0	1 (3)	
Induction failure AML	4 (7)	0	4 (14)	
Initial palliative care at relapse, n (%)	39 (65)	19 (61)	20 (69)	0.725
Median months since initial diagnosis (IQR)	20 (12–37)	36 (23–48)	14 (4–19)	<0.001
<b>Guardian and household characteristics</b>				
<b>Primary caregiver(s)*, n (%)</b>				
Mother	56 (93)	28 (90)	28 (97)	0.654
Father	40 (67)	19 (61)	21 (72)	0.523
Other	12 (20)	8 (26)	4 (14)	0.401
<b>Mother's characteristics, n (%)</b>				
Unemployed	34 (57)	16 (52)	18 (62)	0.578
Education less than high school	28 (47)	12 (39)	16 (55)	0.427
<b>Father's characteristics, n (%)</b>				
Unemployed	6 (10)	2 (7)	4 (14)	0.605
Education less than high school	22 (37)	9 (29)	13 (45)	0.437
Median number of household members (IQR)	5 (4–6)			
Annual household income less than \$2000, n (%)	26 (43)	13 (42)	13 (45)	1.000
Access to a phone, n (%)	59 (98)	31 (100)	28 (97)	0.973
Mode of transportation public, n (%)	52 (87)	29 (94)	23 (79)	0.214
Running water at home, n (%)	45 (75)	24 (77)	21 (72)	0.881
Median minutes to nearest hospital (IQR)	40 (29–60)	35 (20–60)	40 (30–60)	0.407
Median minutes to Bloom Hospital (IQR)	120 (85–180)	120 (90–180)	120 (60–180)	0.923

Difficulty bringing child to hospital, n (%)				
Never or rarely	29 (48)	15 (48)	14 (48)	
Sometimes	19 (32)	10 (32)	9 (31)	
Almost always or always	12 (20)	6 (19)	6 (21)	
Barriers to bringing child to hospital, n (%)				
Other children	6 (10)	4 (13)	2 (7)	0.731
Money	38 (63)	21 (68)	17 (59)	0.642
Taking time off work	4 (7)	2 (7)	2 (7)	1.000
Distance to hospital	4 (7)	1 (3)	3 (10)	0.557

\*Possible to have more than one primary caregiver type.

†Continuous variables compared using Wilcoxon rank-sum test, while categorical variables compared using Fisher’s exact test.

ALL, acute lymphoblastic leukaemia; AML, acute myeloid leukaemia.

In our study, the median proxy-reported physical health scores were greater than 80 at 10 of 12 follow-up assessment time points. In contrast, the median proxy-reported physical health reported for newly diagnosed children with AML in the Children’s Oncology Group (COG) AAML1031 study ranged from 53 to 66 using the same QoL instrument.<sup>22</sup> Similarly, in our study, the median general fatigue scores were 75 or greater at 11 of 12 follow-up assessment time points. In contrast, the median fatigue scores in the COG AML study ranged from 50 to 58. These findings suggest that QoL is higher (better) for patients with leukaemia with relapse or induction failure in El Salvador compared with patients with newly diagnosed AML in North America. This pattern may have occurred because AML treatment is more intensive in North America compared with relapsed leukaemia treatment in El Salvador or because supportive care is better in El Salvador. In terms of the latter possibility, supportive care may be optimised through a twining programme with St Jude Children’s Hospital, a palliative and supportive care clinic funded by Fundación Ayúdame a Vivir with governmental aid, or support of nurse educators through the Association of Pediatric Hematology/Oncology Nurses. The other possibility is that perceptions of guardians are different between the two settings.



**Table 2** *Guardian proxy-reported quality of life over time (N=60)*

	<b>Baseline</b>	<b>6 months</b>	<b>12months</b>	<b>18 months</b>	<b>24 months</b>
Remaining, n	60	37	22	21	15
<b>Generic Core Scales</b>					
Physical health summary	77 (49–94)	81 (47–97)	88 (73–96)	94 (63–94)	97 (69–100)
Psychosocial summary	70 (57–79)	80 (55–87)	74 (64–87)	78 (58–88)	80 (63–89)
Emotional functioning	58 (44–70)	75 (50–90)	75 (65–89)	80 (65–90)	83 (63–90)
Social functioning	85 (65–95)	80 (60–85)	83 (66–90)	80 (70–100)	95 (64–100)
School functioning	70 (50–80)	75(60–85)	80 (55–75)	65 (65–85)	70 (50–80)
<b>Acute Cancer Module</b>					
Pain and hurt	75 (50–100)	88 (50–100)	100 (88–100)	75 (63–100)	100 (75–100)
Nausea	75 (50–90)	75 (50–90)	80 (53–90)	70 (55–80)	75 (58–83)
Procedural anxiety	50 (17–67)	58 (25–83)	58 (35–90)	58 (42–92)	67 (54–79)
Treatment anxiety	79 (50–100)	92 (58–100)	88 (75–100)	100 (100–100)	100 (75–100)
Worry 75 (48–100)	100 (67–100)	67 (50–96)	67 (50–83)	75 (54–92)	
Cognitive problems	80 (56–94)	75 (60–95)	78 (59–95)	80 (50–88)	88 (75–89)
Perceived physical appearance	75 (50–100)	75 (58–100)	75 (58–100)	83 (50–100)	75 (50–83)
Communication	67 (50–100)	83 (58–100)	79 (50–100)	75 (50–100)	75 (58–92)
<b>Multidimensional Fatigue Scale</b>					
General fatigue	81 (45–92)	75 (50–100)	85 (60–96)	88 (67–100)	92 (71–100)
Sleep/rest fatigue	83 (63–92)	83 (58–100)	94 (72–100)	92 (79–100)	92 (69–100)
Cognitive fatigue	88 (70–100)	83 (58–100)	67 (55–88)	67 (58–79)	75 (60–94)

Data shown as median (IQR) every 6 months.

See online supplemental etable 3 for each assessment. Online supplemental etable 4 shows the median guardian self-reported assessments of parent functioning and family functioning at each time point. Online supplemental etable 5 shows child's self-reported QoL over time.

**Table 3.** *Factors associated with guardian proxy-reported child quality of life over time\**

Variable	Physical health	Pain and hurt	Fatigue	Parent QoL
Initial curative intent (vs initial palliative intent)	8.4 (5.1 to 11.6), p<0.0001	5.4 (1.5 to 9.2), p=0.007	6.6 (3.2 to 9.9), p=0.0002	1.0 (−0.8 to 2.8), p=0.294
Child age in years	0.0 (−0.5 to 0.5), p=0.900	0.1 (−0.3 to 0.5), p=0.606	0.1 (−0.3 to 0.5), p=0.608	−0.1 (−0.2 to 0.1), p=0.508
Male sex	0.3 (−3.2 to 3.8), p=0.877	0.6 (−1.9 to 3.1), p=0.664	−0.5 (−3.4 to 2.4), p=0.743	−0.6 (−1.6 to 0.4), p=0.260
Relapsed acute lymphoblastic leukaemia (vs other)	1.6 (−3.5 to 6.8), p=0.545	−1.6 (−5.5 to 2.3), p=0.429	−1.3 (−5.6 to 3.1), p=0.572	−0.7 (−2.2 to 0.8), p=0.394
Any guardian unemployed	−0.4 (−3.8 to 3.0), p=0.824	−0.4 (−3.0 to 2.2), p=0.769	−0.6 (−3.6 to 2.3), p=0.679	−0.2 (−1.2 to 0.8), p=0.711
Mother with less than high school education	−0.4 (−3.8 to 3.1), p=0.841	0.7 (−1.9 to 3.3), p=0.600	0.2 (−2.7 to 3.2), p=0.894	0.6 (−0.4 to 1.6), p=0.231
Father with less than high school education	−2.4 (−7.3 to 2.5), p=0.359	−1.5 (−5.1 to 2.0), p=0.412	−1.5 (−5.1 to 2.0), p=0.412	−0.1 (−1.1 to 0.9), p=0.891
Family income less than \$2000 annually	1.6 (−1.6 to 4.9), p=0.338	2.1 (−0.1 to 4.3), p=0.085	1.5 (−1.3 to 4.3), p=0.303	0.6 (−0.4 to 1.5), p=0.263
Initial palliative care involvement	2.6 (−1.2 to 6.3), p=0.205	1.5 (−1.1 to 4.2), p=0.274	0.2 (−2.8 to 3.3), p=0.881	0.2 (−0.8 to 1.2), p=0.710

\*Values shown are estimate (95% CI) of the interaction between the variable of interest (eg, curative intent) and assessment time point (0–24 months). A statistically significant p value suggests that quality of life is significantly different over time depending on the variable of interest.

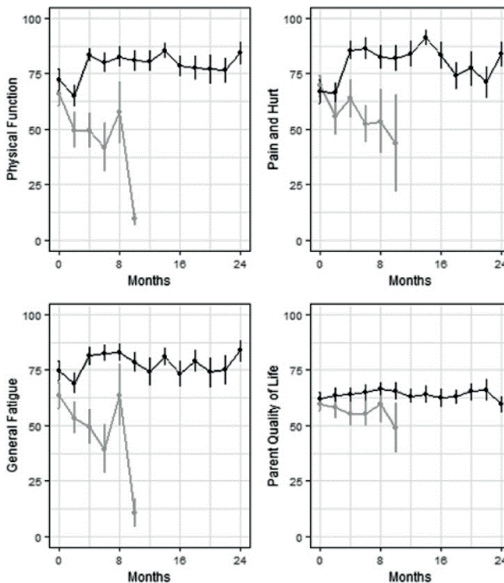
**QoL, quality of life.**

The strengths of this study include its prospective design among an important and understudied population. The design allowed a unique opportunity to measure the impact of initial curative versus palliative intent of therapy, a comparison which is not amenable to randomisation. The lack of missing data is another important strength, with no missing proxy-report QoL scores among children who died. Consequently, responder bias does not explain our findings. However, this study must also be interpreted in light of its limitation.

The main limitation was the small number of children who self-reported their QoL and consequently the need to rely on proxy report. Another limitation is that we did not evaluate specific chemotherapy medications and their impact on QoL, although this would have been challenging given the number of different chemotherapies, dosages and schedules that would have been used.

In conclusion, among paediatric patients with acute leukaemia at relapse or induction failure, initial curative intent treatment plan was associated with better physical health, pain and fatigue when compared with palliative intent. A curative approach may be a reasonable option for patients with acute leukaemia even when prognosis is poor.

**Figure 2.** Child's physical health, pain and general fatigue and parents' quality of life stratified by initial curative intent versus palliative intent at enrolment (N=60). The graph depicts mean proxy-reported physical health, pain and fatigue, and guardian self-reported quality of life. The vertical lines represent the SE. The black line represents those treated with curative intent at enrolment, while the red line represents those treated with palliative intent at enrolment. Enrolment occurred within 1 month of relapse or induction failure



**Contributors** Development of protocol: all. Data collection: CS, EP, RV and SF-A. Analysis: GAT and LS. Drafting of manuscript: EP and LS. Critical revision of manuscript: all.

**Approval of manuscript:** all.

**Funding** This research was funded by The Hospital for Sick Children's Global Child Health Catalyst Grant.

**Competing interests.** None declared.

**Patient consent for publication.** Not required.

**Ethics approval.** The study was approved by the Research Ethics Boards at Hospital Bloom (San Salvador) and The Hospital for Sick Children (Toronto).

**Provenance and peer review.** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Data availability statement.** Data are available by reasonable request to the corresponding author.

**ORCID iD.** Lillian Sung [http:// orcid. org/ 0000- 0003- 0951- 3091](http://orcid.org/0000-0003-0951-3091)

## References

1. Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011; 29: 551–65.
2. Freyer DR, Devidas M, La M, et al. Postrelapse survival in childhood acute lymphoblastic leukemia is independent of initial treatment intensity: a report from the children's Oncology Group. *Blood* 2011; 117: 3010–5.
3. Gorman MF, Ji L, Ko RH, et al. Outcome for children treated for relapsed or refractory acute myelogenous leukemia (rAML): a therapeutic advances in childhood leukemia (TACL) Consortium study. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55: 421–9.
4. Ko RH, Ji L, Barnette P, et al. Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia Consortium study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 648–54.

5. Malempati S, Gaynon PS, Sather H, et al. Outcome after relapse among children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: children's Oncology Group study CCG-1952. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5800–7.
6. Mitsui T, Mori T, Fujita N, et al. Retrospective analysis of relapsed or primary refractory childhood lymphoblastic lymphoma in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52: 591–5.
7. Nguyen K, Devidas M, Cheng S-C, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008; 22: 2142–50.
8. Sander A, Zimmermann M, Dworzak M, et al. Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2010; 24: 1422–8.
9. Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-Term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of- relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2339–47.
10. von Stackelberg A, Völzke E, Köhl J-S, et al. Outcome of children and adolescents with relapsed acute lymphoblastic leukaemia and non-response to salvage protocol therapy: a retrospective analysis of the ALL-REZ BFM Study Group. *Eur J Cancer* 2011; 47: 90–7.
11. Bonilla M, Gupta S, Vasquez R, et al. Predictors of outcome and methodological issues in children with acute lymphoblastic leukaemia in El Salvador. *Eur J Cancer* 2010; 46: 3280–6.
12. Gupta S, Bonilla M, Fuentes SL, et al. Incidence and predictors of treatment-related mortality in paediatric acute leukaemia in El Salvador. *Br J Cancer* 2009; 100: 1026–31.

13. Tomlinson D, Bartels U, Gammon J, et al. Chemotherapy versus supportive care alone in pediatric palliative care for cancer: comparing the preferences of parents and health care professionals. *CMAJ* 2011; 183: E1252–8.
14. Klassen AF, Klaassen R, Dix D, et al. Impact of caring for a child with cancer on parents' health-related quality of life. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5884–9.
15. Varni JW, Burwinkle TM, Katz ER, et al. The PedsQL in pediatric cancer: reliability and validity of the pediatric quality of life inventory generic core scales, multidimensional fatigue scale, and cancer module. *Cancer* 2002; 94: 2090–106.
16. Hays RM, Valentine J, Haynes G, et al. The Seattle pediatric palliative care project: effects on family satisfaction and health-related quality of life. *J Palliat Med* 2006; 9: 716–28.
17. Varni JW, Katz ER, Seid M, et al. The pediatric cancer quality of life inventory-32 (PCQL-32). *Cancer* 1998; 82: 1184–96.
18. Varni JW, Sherman SA, Burwinkle TM, et al. The PedsQL family impact module: preliminary reliability and validity. *Health Qual Life Outcomes* 2004; 2: 55.
19. Sung L, Yanofsky R, Klaassen RJ, et al. Quality of life during active treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 2011; 128:1213–20.
20. Sung L, Klaassen RJ, Dix D, et al. Identification of paediatric cancer patients with poor quality of life. *Br J Cancer* 2009; 100:82–8.
21. Tomlinson D, Bartels U, Hendershot E, et al. Factors affecting treatment choices in paediatric palliative care: comparing parents and health professionals. *Eur J Cancer* 2011; 47: 2182–7.
22. Nagarajan R, Gerbing R, Alonzo T, et al. Quality of life in pediatric acute myeloid leukemia: report from the children's Oncology Group. *Cancer Med* 2019; 8: 4454–64.

# The Cost and Cost-Effectiveness of Childhood Cancer Treatment in El Salvador, Central America: A Report From the Childhood Cancer 2030 Network

**DOI: 10.1002/cncr.31022, Received: July 5, 2017; Revised: July 24, 2017; Accepted: August 21, 2017, Published online September 15, 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)**

**Corresponding author:** Susan E. Horton, BA, MA, PhD, School of Public Health and Health Systems, University of Waterloo, 200 University Ave West, Waterloo ON N2L 3G1, Canada;  
[sehorton@uwaterloo.ca](mailto:sehorton@uwaterloo.ca)

Soad Fuentes-Alabi, MD, MPH<sup>1</sup>  
Nickhill Bhakta, MD, MPH<sup>2</sup>  
Roberto Franklin Vásquez, MD<sup>1</sup>  
Sumit Gupta, MD, PhD, FRCPC<sup>3,4</sup>  
Susan E. Horton, BA, MA, PhD<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology, Benjamin Bloom Hospital, San Salvador, El Salvador;

<sup>2</sup>Department of Global Pediatric Medicine, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; <sup>3</sup>Division of Hematology/Oncology, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; <sup>4</sup>Child Health Evaluative Sciences, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; <sup>5</sup>Global Health Economics, School of Public Health and Health Systems, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.

**Background.** Although previous studies have examined the cost of treating individual childhood cancers in low-income and middle-income countries, to the authors' knowledge none has examined the overall cost and cost-effectiveness of operating a childhood cancer treatment center. Herein, the authors examined the cost and sources of financing of a pediatric cancer unit in Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom in El Salvador, and make estimates of cost-effectiveness.

**Methods.** Administrative data regarding costs and volumes of inputs were obtained for 2016 for the pediatric cancer unit. Similar cost and volume data were obtained for shared medical services provided centrally (eg, blood bank). Costs of central nonmedical support services (eg, utilities) were obtained from hospital data and attributed by inpatient share. Administrative data also were used for sources of financing. Costeffectiveness was estimated based on the number of new patients diagnosed annually and survival rates.

**Results.** The pediatric cancer unit cost \$5.2 million to operate in 2016 (treating 90 outpatients per day and experiencing 1385 inpatient stays per year). Approximately three-quarters of the cost (74.7%) was attributed to 4 items: personnel (21.6%), pathological diagnosis (11.5%), pharmacy (chemotherapy, supportive care medications, and nutrition; 31.8%), and blood products (9.8%). Funding sources included government (52.5%), charitable foundations (44.2%), and a social security contribution scheme (3.4%). Based on 181 new patients per year and a 5-year survival rate of 48.5%, the cost per disability-adjusted life-year averted was \$1624, which is under the threshold considered to be very cost effective.

**Conclusions.** Treating childhood cancer in a specialized unit in low-income and middleincome countries can be done cost-effectively. Strong support from charitable foundations aids with affordability. Cancer 2018; 124:391-7. © 2017 American Cancer Society.

**Keywords:** cancer, cost-effectiveness, economic evaluation, oncologic services, pediatric hospitals.

## Introduction

For children diagnosed with cancer who live in high-income countries with access to modern therapy, survival rates currently are >80%.<sup>1</sup> However, in low-income and middle-income countries (LMICs), where approximately 90% of the pediatric population lives, survival estimates vary between 10% and 50%.<sup>2</sup> A major factor limi-



ting efforts to improve childhood cancer survival in LMICs remains the perception that pediatric oncology services are “too expensive” for LMIC health systems to absorb. Despite this assumption, to our knowledge the financial and economic costs required to treat pediatric cancer in LMICs remain largely unknown.

Several publications have described limited aspects of this costing narrative in LMICs by focusing on specific cancer treatments, protocols, or procedures.<sup>3-5</sup> Others have compared the cost-effectiveness of different treatment components for specific cancers.<sup>6,7</sup> The methods used have varied substantially in terms of rigor, estimation approaches, and from whose perspective the costs were calculated.

Most important, to our knowledge, no data describing the global costs of running a childhood cancer service in an LMIC have been published to date. This represents a major gap, with negative downstream implications for national cancer control planning and hospital-based implementation. This paucity of data is particularly concerning given a recent cost-effectiveness analysis suggesting that curing several types of childhood cancers may even be very costeffective in low-income countries. In anticipation of an upcoming commission in The Lancet Oncology focused on sustainable pediatric cancer care, we have developed and applied a transparent method with which to estimate both the total cost and cost-effectiveness of maintaining what to our knowledge is the only comprehensive pediatric cancer treatment program in El Salvador.

## Materials and methods

The current study used hospital administrative data for 2016 to report the costs of running and maintaining a pediatric cancer unit in Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom (HNNBB), a public referral and teaching hospital for children in San Salvador, El Salvador, using the hospital’s perspective. Costs were compared with the average 5-year survival rate for all presenting cases for 2012 through 2016 across all types of pediatric cancers treated. Because this study

used deidentified and aggregated administrative data, the requirement for institutional review board approval was waived.

## **Study Site**

HNNBB is a 300-bed tertiary referral hospital with 1350 employees and 300,000 patient visits annually.<sup>8</sup> The oncology department is 1 of 30 departmental subspecialties. The department diagnoses an average of 180 new patients per year, has 24 inpatient beds, and includes an outpatient clinic that has >30,000 patient visits annually. Some services and staff are dedicated to the unit, whereas other specialized services, including surgery, pathology, imaging, pharmacy, radiation, and blood bank, as well as nonmedical central services, including utilities and purchasing and contracting services, are shared across the hospital. The HNNBB department is the main treatment center for childhood cancer in El Salvador, with treatment programs focusing on leukemias, lymphomas, and solid tumors such as Wilms tumor and sarcomas. The department treats children aged  $\leq 14$  years, with an average age at the time of diagnosis of 6 years.

The pediatric oncology program is financially sustained primarily by the Ministry of Health and the private nonprofit foundation “Ayudame a Vivir.” Other partners or collaborators include the Association of Parents of Children with Cancer (ASAPAC), El Salvador’s Institute of Social Security, and St. Jude Children’s Research Hospital. The ASAPAC plays an important role in the day-to-day operation of the pediatric oncology program, including fundraising and providing financial assistance to very low-income families for transportation, meals, laboratory tests, and some medications not funded by the national health care system.

## **Data Collection**

Because the department of oncology is a separate administrative unit within HNNBB, we were able to obtain aggregated informa-

tion regarding the hospital costs associated with diagnosing and treating childhood cancer. To collect costing data, a detailed abstraction tool was developed after compartmentalizing costs into the following categories: personnel (both medical and support), other services (information technology, training), room and board for patients and for their families (“hoteling”), outpatient clinic, shared services (pharmacy, pathology, surgery, radiation, imaging, and blood bank), and other central hospital services (utilities, human resources, etc). The structure of the abstraction tool is available in the Supporting Information Table 1. The personnel cost of running a population-based cancer registry and outcometracking tool also was included in the total for personnel, given the importance of such efforts.<sup>9,10</sup>

Information regarding the volume and unit cost of items came from various sources. The pediatric oncology unit has its own information system with data regarding the number of personnel dedicated to the department and their salaries and services specific to the unit (laboratory information system, training, and space for the outpatient clinic) as well as costs and quantity of some of the shared hospital services used by the department (pharmacy, pathology, and blood services). In other cases of shared services (surgery, imaging, and radiotherapy), key personnel were consulted regarding the percentage of their time/ workload attributable to pediatric oncology; costs were prorated. Overhead costs from central administration were obtained from the budget of the hospital overall and covered the cost of essential central functions such as utilities and purchasing and contracting services. These were attributed according to the pediatric oncology unit share of total inpatient admissions (11.2%).

For inpatient “hoteling” costs, we used the World Health Organization (WHO)-CHOICE<sup>11</sup> value for El Salvador for 2008, updated to 2016 using the US consumer price index.<sup>12</sup> For intensive care unit beds, we multiplied this value by 3.5, the ratio of the cost per day for the intensive care unit compared with that of a regular hospital bed in the El Salvador government fee structure.

Table 1. Variables and Sources Included in the Cost-Effectiveness Model

Variables	Values	Values
Discount rate	0.03 (0, 0.06)	WHO-CHOICE
El Salvador life expectancy, 2015 (latest available)	73	World Bank
Mean age at diagnosis	6	HNNBB-provided data
Duration of disability (length of therapy)	2	Assumed length of therapy
Disability weight during therapy	0.288	GBD 201614
Utility score at age 24 y using MEPS <sup>a</sup>	0.826	Yeh 201615
Utility score at age 35 y using MEPS <sup>a</sup>	0.81	Yeh 201615
Utility score at age 24 y using CCSS survivors <sup>b</sup>	0.779	Yeh 201615
Utility score at age 35 y using CCSS survivors <sup>b</sup>	0.766	Yeh 201615
No. of new incident cases	181	HNNBB-provided data
Proportion of patients with 5-y overall survival	0.49	HNNBB-provided data
El Salvador GDP per capita 2015 (latest available)	4219	World Bank

*Abbreviations:* CCSS, Childhood Cancer Survivor Study; GBD, Global Burden of Disease; GDP, gross domestic product; HNNBB, Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom; MEPS, Medical Expenditures Panel Survey; WHO, World Health Organization.

<sup>a</sup> MEPS provides utility weights generalizable to the US general population.<sup>16</sup>

<sup>b</sup>CCSS provides utility weights for late effects for those who received treatment for cancer in childhood.<sup>17</sup>

The number of inpatients and outpatients per year, the number of new childhood cancer cases per year, and estimated survival rates were taken from the Morbi- Mortality Information System of the Ministry of Health of El Salvador (SIMMOW),<sup>13</sup> which is based on the population-based pediatric cancer registry maintained by HNN-BB. To make cost-effectiveness estimates, we assumed that all children diagnosed with cancer would die if left untreated. Five-year survival rates were obtained from the registry, using data from new cases for 2012 through 2016. We compared the costs of treatment in 2016 with 5-year survival data to 2016, thereby using a prevalence rather than incidence-based calculation.

## Cost-Effectiveness Analysis

Cost-effectiveness was calculated using the disability-adjusted life-years (DALYs) approach used by the Global Burden of Disease (GBD)<sup>14</sup> study. Full details and citations of model variables used are provided in Table 1.<sup>15-17</sup> Full model calculations of years of life lost and years lived with disability were adapted from previously published models,<sup>18</sup> and are available for review in Supporting Information Table 1. Because the average length of therapy varies based on the type of cancer, we used an assumed average of 2 years “on therapy” to calculate years lived with disability.

We also varied 3 parameters in sensitivity analyses: discount rate, extent of excess long-term morbidity, and years of life lost as a result of earlier mortality due to late effects associated with cancer. First, a discount rate of 3% was used for the base case, with alternate values of 0% and 6%. Second, to address the observed excess morbidity associated with surviving childhood cancer,<sup>17</sup> we used published utility scores from the Medical Expenditure Panel Survey (MEPS),<sup>16</sup> a sample representative of the US general population, and the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS), a prospective cohort survey of 5-year cancer survivors in the United States and Canada, to derive proxy disability weights. This approach was selected because the GBD does not account for cancer-related late effects and no disability weight for survivorship exists within the GBD framework.<sup>19</sup> To derive a disability weight to account for the excess morbidity associated with childhood cancer treatment, the proportional difference between MEPS and CCSS utility scores at any given age was used. MEPS and CCSS data are only available at 3 age points, and therefore 1-way interpolation was applied to obtain weights at different ages within the range of known data points. Finally, to account for early mortality, we varied a possible reduction in life expectancy from 0% to 30%, a range that incorporates estimates of early mortality from the United States.<sup>20,21</sup> In total, 15 scenarios thus were modeled (sensitivity analysis).

Final cost-effectiveness analyses were calculated for each scenario in both the base case and the sensitivity analyses. As per

WHO-CHOICE criteria,<sup>11</sup> an intervention is considered to be “cost effective” if the cost to avert 1 DALY is between 1 to 3 times a country’s gross domestic product (GDP) per capita. The intervention is considered to be “very cost effective” if the cost is <1 times the GDP per capita. Interventions costing >3 times the GDP per capita per DALY averted are not considered to be costeffective.

**Table 2.** *Annual Costs of Operating a Pediatric Oncology Department by Major Cost Category*

Input	Quantity	Annual Cost, US\$	Percentage of Total Cost
<b>Personnel</b>			
Medicals	65 FTE	840.6	
Nonmedicalb	20 FTE	280.6	
Subtotal: personnel		1121.2	21.6
<b>Hoteling</b>			
General wardc	3.63/d (average)	61.9	
ICU	0.92/d (average)	57.3	
Local housing and per diem for families	5 families/d	116.9	
Subtotal: hoteling		236.1	4.5
Subtotal: outpatient clinicd		135.1	2.6
Subtotal: other services (training, laboratory information)		69.4	1.3
<b>Shared hospital medical services</b>			
Pathology		600.0	
Pharmacy		1654.8	
Radiation		51.9	
Imaging		71.2	
Surgery (operating room)		130.0	
Blood services		510.6	
Subtotal: shared hospital medical services		3018.5	58.1
Subtotal: utilitiese		78.3	1.5
Subtotal: central administration coste		537.6	10.3
Total		5195.8	100.0

*Abbreviations:* FTE, full-time equivalent; ICU, intensive care unit.

<sup>a</sup> Includes oncologists (4 FTE), pediatricians (3 FTE), radiation oncologists (4 FTE), pharmacists (4 FTE), nurses (40 FTE), a general surgeon (1 FTE), an orthopedic surgeon (1 FTE), neurosurgeons (4 FTE), pathologists (2 FTE), laboratory technicians (2 FTE), and a pain specialist (1 FTE).

<sup>b</sup> Includes a departmental registrar (1 FTE), a cancer registrar (1 FTE), oncologi-

cal psychiatrists (2 FTE), social workers (2 FTE), an ambulance driver (1 FTE), secretarial support (3 FTE), managers (3 FTE), warehouse personnel (2 FTE), an accountant (1 FTE), and data entry personnel (3 FTE).

<sup>c</sup> Includes cost of cleaning, maintenance, laundry, food for patients, etc. Costs of cooks (3 FTE), maintenance personnel (7 FTE), and security personnel (2 FTE) are incorporated here.

<sup>d</sup> Includes space cost for outpatient clinic; treatment costs for outpatients are included under various treatment headings.

<sup>e</sup> Includes the unit's share of central utilities and purchasing and contracting administration costs, weighted by cancer unit share of Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom total inpatient stays (11.2%).

## Results

A total of 907 new cases of childhood cancer were treated at HNNBB between 2012 and 2016. This cohort included 434 cases of leukemia (47.9%), 355 (39.1%) of which were acute lymphoblastic leukemia. The remaining cases included cases of lymphoma (94 cases; 10.4%), central nervous system tumors (88 cases; 9.7%), and various extracranial solid tumors (291 cases; 32.1%). The 5-year overall survival rate for the entire cohort was  $48.5\% \pm 5.6\%$ . Of the entire cohort, only 1 patient withdrew from therapy.

Table 2 summarizes the total cost and its major components. Supporting details (unit costs and quantities) are shown in Supporting Information Table 1. Personnel and shared hospital medical services accounted for approximately 88.8% of costs. The largest individual costs were personnel (24.0%), pathologic diagnosis (12.9%), pharmacy (including chemotherapy, supportive care medications, and nutrition; 35.5%), and blood services (11.0%). All other categories (radiation, imaging, surgery, hoteling, utilities, and "other") accounted for <11% combined. The annual cost totaled \$5.2 million (ie, \$28,707 per year per newly diagnosed child).

The financing of care for pediatric oncology costs came primarily from 2 major sources: the government and HNNBB's nonprofit

foundation Ayudame a Vivir. Ayudame a Vivir covered the salary of 30 medical personnel (20 of the 40 nurses, 2 pediatricians, 4 oncologists, 3 laboratory technicians, and a portion of the salary for 1 surgeon). The same foundation also covered all costs related to diagnostic pathology, chemotherapy, supportive care medications, and anesthesia associated with radiotherapy. The government contributory social security scheme, Institute of Social Security, covered the cost of the time needed for radiotherapy and the salary of 4 radiation oncologists. ASAPAC covered the cost of room and board for families accompanying their children. St. Jude's Children's Research Hospital provided significant funding to Ayudame a Vivir historically, and continues to provide about 10% of the funds raised annually by the foundation. St. Jude's also provides significant technical and educational assistance, both of which were felt by stakeholders to be critical to HNBBB's historical success. The government covered all other costs within the pediatric oncology unit. In total, just greater than one-half of the associated costs of treatment were financed by the government (52.5%), with the rest provided by Ayudame a Vivir (42.9%), other foundations (1.3%), and the social security contributory scheme (3.4%). This calculation excludes the \$616,000 in costs of central hospital administration and utilities.

The parameters used to determine the costeffectiveness of treating childhood cancer in El Salvador are detailed in Table 1. The results of the analysis are summarized in Table 3. The cost to avert 1 DALY in the base case model (no early mortality or excess morbidity; 3% discounting) was \$1624 compared with El Salvador's GDP per capita of \$4219 in 2015 (GDP data for 2016 were not yet available). This is very cost effective as per WHO-CHOICE criteria. In 2-way sensitivity analyses that allowed for variation in the discount rate weights, possible excess morbidity late effects as a result of childhood cancer therapy, and possible early mortality as a result of childhood cancer therapy, the resultant costs always remained very cost effective (ie, below the threshold of 1 times the GDP per capita).



**Table 3.** *Cost per DALY Averted, Base Case and Sensitivity Analysis*

Scenarios of LEa and Late Effect Morbidity	Discounting		
	0%	3%	6%
Base case (normal LE, no utility adjustment for late effect morbidity)	\$878	\$1624	\$2857
Normal LE plus utility adjustment for late effect morbidity	\$936	\$1643	\$2866
10% reduction in LE plus utility adjustment for late effect morbidity	\$1038	\$1681	\$2885
20% reduction in LE plus utility adjustment for late effect morbidity	\$1186	\$1747	\$2923
30% reduction in LE plus utility adjustment for late effect morbidity	\$1382	\$1851	\$2995

*Abbreviations:* DALY, disability-adjusted life-year; LE, life expectancy.

*a* Decrements in LE.15,30

## Discussion

To the best of our knowledge, the current study is the first published study to date describing the costs, financing, and cost-effectiveness of a comprehensive childhood cancer treatment center in an LMIC. Previous work in this area has calculated the costs for specific childhood cancer treatment protocols, often not taking into account patients who do not complete treatment, and has not presented cost-effectiveness estimates.<sup>3-5</sup> The current analysis suggests that treating selected childhood cancers within the context of a high-functioning center is a very cost-effective opportunity in an LMIC. In the current study, we developed a reporting tool to assist health centers when calculating the complete costs necessary to treat childhood cancer. In addition, after applying this tool at HNNBB in El Salvador and combining our cost estimates with the survival data available, the results herein demonstrated that even when late effects and early mortality are incorporated, childhood cancer treatment strategies in El Salvador are very cost effective as per the WHO-CHOICE definitions used to prioritize health interventions.

We found that the cost per year per newly diagnosed case was \$28,707. This per-patient cost generally is higher than treatment costs reported in studies for individual cancers for LMICs.<sup>3-5</sup> Studies of individual cancers often do not include costs for those patients who abandon therapy or who die of treatment-related toxicity. Global costs associated with running a childhood cancer unit also rarely are included. Therefore, the data provided in the current study are more comprehensive and reliable.

At the same time, these results highlight the issue of affordability as being distinct from cost-effectiveness. The cost per year per newly diagnosed case of \$28,707 compares with a per-capita health expenditure in El Salvador in 2014 of only \$280 (data for 2016 were not yet available).<sup>22</sup> Therefore, the question of how childhood cancer treatment can be successfully financed in LMICs is of significant importance.

In the case of HNNBB, the hospital has been successful in maintaining a strong program with the assistance of private foundations that provided 44.2% of the funding for pediatric oncology (not counting the central hospital administration costs). The hospital foundation Ayudame a Vivir funded all chemotherapy and supportive care as well as key personnel (approximately one-half of the complement of nurses, all the oncologists, and both pediatricians). Ayudame a Vivir has supported the unit for >25 years, and is currently funded predominantly (approximately 94%) through Salvadoran philanthropy and revenue streams. Strong support from charitable foundations also has been described as a key component of successful childhood cancer treatment centers in other countries.<sup>23, 24</sup> Such support may include the financing of core and ancillary costs, educational campaigns, family support groups, and advocacy targeting governments and other stakeholders. Without the support of Ayudame a

TABLE 3. Cost per DALY Averted, Base Case and Sensitivity Analysis Discounting Scenarios of LEa and Late Effect Morbidity

	0%	3%	6%
Base case (normal LE, no utility adjustment for late effect morbidity)	\$878	\$1624	\$2857
Normal LE plus utility adjustment for late effect morbidity	\$936	\$1643	\$2866
10% reduction in LE plus utility adjustment for late effect morbidity			

lity adjustment for late effect morbidity \$1038 \$1681 \$2885 20% reduction in LE plus utility adjustment for late effect morbidity \$1186 \$1747 \$2923 30% reduction in LE plus utility adjustment for late effect morbidity \$1382 \$1851 \$2995 Abbreviations: DALY, disability-adjusted life-year; LE, life expectancy. a Decrements in LE.<sup>15,30</sup> Cost of Childhood Cancer Treatment in El Salvador/Fuentes-Alabiet al Cancer January 15, 2018 395 Vivir and other foundations, the ability of HNNBB to achieve the cancer outcomes described in the current study would likely be severely impacted.

Charitable support also allowed the unit to hire psychologists and social workers, who have been key to reducing treatment abandonment.<sup>25</sup> Abandonment of treatment, a complex phenomenon with multiple contributing factors, represents a common cause of treatment failure in many LMIC settings.<sup>26-28</sup> The parental foundation ASAPAC also was instrumental in decreasing local abandonment rates by funding accommodation; per diems; and, when necessary, medication for parents with limited incomes. Future costing studies in LMIC childhood cancer therefore must include costs associated with psychosocial and family support because they are integral determinants of survival outcomes.

Limitations of the costing component of the current study included the inability to fully cost all inputs. For example, we did not have a cost estimate associated with the rental of space for inpatients. We assumed that the hospital rates charged for services such as operating theaters, pathology, and radiation included the amortization costs of equipment. We did not have financial records to allocate the shared services of surgery, imaging, and radiotherapy, and relied instead on self-reporting by key personnel concerned. However these 3 components combined account for <5% of the overall treatment cost, and thus any resultant recall bias or misclassification is likely modest in size. Because we only examined costs incurred at a children's hospital, costs associated with the late effects of treatment among cancer survivors after the age of 14 years (at which time they would be treated at an adult hospital) were not included. We also did not include indirect costs borne by the families (loss of work time

caring for their child, traveling to get treatment, additional costs of medication, etc.) and instead restricted our analyses to the perspective of the hospital. Other studies for LMICs have shown that indirect costs often can be considerable for the family and can lead to treatment abandonment.<sup>29</sup> Despite these limitations, to the best of our knowledge the current study represents the most comprehensive costing of LMIC childhood cancer treatment to date.

Limitations of the cost-effectiveness analysis mainly are a reflection of the lack of LMIC-specific late-effect data in the published literature. The GBD does not account for late effects of cancer (childhood or adult) in their DALY estimation methods. We instead used utility estimates for childhood cancer survivors<sup>15</sup> in an American population that may not reflect cultural variations in health-related quality of life. In addition, although early mortality<sup>20, 30</sup> for childhood cancer survivors is well described in high-income countries, the question of whether these data are generalizable to LMICs is uncertain. To the best of our knowledge, there currently are no LMIC survivorship cohort studies with which to anchor our sensitivity analysis. Weaker health systems in LMICs would suggest that patients who develop early morbidity would die even earlier due to the lack of appropriate care, potentially making the results of the current study overly optimistic. Conversely, LMIC treatment protocols often are of lower intensity than those used in high-income countries due to less robust supportive care options (ie, infection control, intensive care, stem cell therapy). Late effects in LMIC survivors may thus be less severe compared with cohorts in high-income countries. It is important to note that sensitivity analyses increasing the theoretical burden of cancer survivorship in the current study did not change the cost-effectiveness of treatment. Finally, the generalizability of the current study results to other LMIC settings and other models of childhood cancer care delivery are unknown. Efforts to duplicate these analyses in other LMIC jurisdictions currently are underway.

The results of the current study provide a framework for reporting the costs of maintaining a comprehensive childhood cancer treatment center in an LMIC and have shown that investments in

this program are very costeffective. These results need to be duplicated in other LMICs, preferably of different income levels. The included tools developed for the current study may be useful in such duplications. Patient advocates and policymakers can use the current study results to inform national childhood cancer strategies that aim to improve childhood cancer outcomes in LMICs. Additional future work will identify costs for treating specific childhood cancer subgroups to help prioritize the allocation of resources.

### **Funding support**

St. Baldrick's Foundation source of funding support is American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC).

### **Conflict of interest disclosures**

Soad Fuentes-Alabi acknowledges funding support from the St. Baldrick's Foundation.

### **Author contributions**

Conceptualization: Nickhill Bhakta, Sumit Gupta, and Susan E. Horton. Data curation: Soad Fuentes-Alabi and Roberto Franklin Vasquez. Formal analysis/software: Soad Fuentes-Alabi, Original Article 396 Cancer January 15, 2018 Nickhill Bhakta, Roberto Franklin Vasquez, and Susan E. Horton. Writing-original draft: Soad Fuentes-Alabi, Nickhill Bhakta, Sumit Gupta, and Susan E. Horton. Writing-review and editing: Soad Fuentes-Alabi, Nickhill Bhakta, Roberto Franklin Vasquez, Sumit Gupta, and Susan E. Horton.

## **References**

1. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2625-2634.
2. Rodriguez-Galindo C, Friedrich P, Alcasabas P, et al. Toward the cure of all children with cancer through collaborative efforts: pediatric oncology as a global challenge. *J Clin Oncol*.

- 2015; 33:3065- 073. 3. Ji X, Xuan Y, Li J, et al. Direct costs for retinoblastoma treatment during the first year of comprehensive therapy in China. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2012; 49:353-358.
3. Luo XQ, Ke ZY, Guan XQ, Zhang YC, Huang LB, Zhu J. The comparison of outcome and cost of three protocols for childhood non-high risk acute lymphoblastic leukemia in China. *Pediatric Blood Cancer*. 2008; 51:204-209.
  4. Stefan DC, Stones D. How much does it cost to treat children with Hodgkin lymphoma in Africa? *Leuk Lymphoma*. 2009; 50:196-199.
  5. Garcia M, Chicaiza LA, Quitian H, Linares A, Ramirez O. Costeffectiveness of consolidation treatments for acute myeloid leukemia in high-risk pediatric patients within the Colombian healthcare system [in Spanish]. *Biomedica*. 2015; 35:549-556.
  6. Garcia-Molina M, Chicaiza-Becerra L, Moreno-Calderon A, Prieto- Martinez V, Sarmiento-Urbina I, Linares-Ballesteros A. 18FDGPET/ CT cost-effectiveness compared to CT at the end of treatment in pediatric Hodgkin's lymphoma patients [in Spanish]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2014; 16:260-269.
  7. Hospital Nacional de Ninos Benjamin Bloom. Hospital services. <http://www.hospitalbloom.gov.sv/principal/historia.html>. Accessed February 7, 2017.
  8. Tangka FK, Subramanian S, Edwards P, et al; Cancer registration economic evaluation participants. Resource requirements for cancer registration in areas with limited resources: analysis of cost data from four low- and middle-income countries. *Cancer Epidemiol*. 2016; 45(suppl 1):S50-S58.
  9. Gupta S, et al. Pediatric oncology as the next global child health priority: The need for national childhood cancer strategies in low- and middle-income countries. *PLoS Med*. 2014; 11:e1001656.

10. World Health Organization. Health service delivery costs. WHOCHOICE unit cost estimates for service delivery. [http://www.who.int/choice/cost-effectiveness/inputs/health\\_service/en/](http://www.who.int/choice/cost-effectiveness/inputs/health_service/en/). Accessed April 21, 2017.
11. US Department of Labor. Bureau of Labor Statistics. Consumer Price Index (all urban consumers) current series. <https://data.bls.gov/cgi-bin/surveymost>. Accessed May 4, 2017.
12. Republic of El Salvador. MorbiMortalidad Estradisticas Vitales (SIMMOW). <http://simmow.salud.gob.sv/>. Accessed May 7, 2017.
13. Murray CJ, Lopez AD, World Health Organization. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Global Burden of Disease and Injury Series, Vol II. Cambridge, MA: Harvard School of Public Health; 1996.
14. Yeh JM, Hanmer J, Ward ZJ, et al. Chronic conditions and utility based health-related quality of life in adult childhood cancer survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2016; 108(9).
15. US Department of Health and Human Services, Agency for Healthcare Research and Quality. Medical Expenditure Panel survey. <https://meps.ahrq.gov/mepsweb/>. Accessed May 7, 2017.
16. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355:1572-1582.
17. Bhakta N, Martiniuk AL, Gupta S, Howard SC. The cost effectiveness of treating paediatric cancer in low-income and middle-income countries: a case-study approach using acute lymphocytic leukaemia in Brazil and Burkitt lymphoma in Malawi. *Arch Dis Child.* 2013; 98:155-160.

18. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted lifeyears for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017; 3:524-548.
19. Armstrong GT, Yasui Y, Robison LL. Reduction in late mortality after childhood cancer. *N Engl J Med.* 2016; 375:290-292.
20. Yeh JM, Nekhlyudov L, Goldie SJ, Mertens AC, Diller L. A model-based estimate of cumulative excess mortality in survivors of childhood cancer. *Ann Intern Med.* 2010; 152:409-417, W131-W138.
21. World Bank. World Bank open data. <http://data.worldbank.org/>. Accessed April 21, 2017.
22. Antillon F, Baez FL, Barr R, et al. AMOR: a proposed cooperative effort to improve outcomes of childhood cancer in Central America. *Pediatr Blood Cancer.* 2005; 45:107-110.
23. Ribeiro RC, Antillon F, Pedrosa F, Pui CH. Global pediatric oncology: lessons from partnerships between high-income countries and low- to mid-income countries. *J Clin Oncol.* 2016; 34:53-61.
24. Salaverria C, Rossell N, Hernandez A, et al. Interventions targeting absences increase adherence and reduce abandonment of childhood cancer treatment in El Salvador. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62: 1609-1615.
25. Bonilla M, Rossell N, Salaverria C, et al. Prevalence and predictors of abandonment of therapy among children with cancer in El Salvador. *Int J Cancer.* 2009; 125:2144-2146.
26. Gupta S, Yeh S, Martiniuk A, et al. The magnitude and predictors of abandonment of therapy in paediatric acute leukaemia in



- middleincome countries: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2013;49:2555-2564.
27. Weaver MS, Howard SC, Lam CG. Defining and distinguishing treatment abandonment in patients with cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015; 37:252-256.
  28. Arora RS, Eden T, Pizer B. The problem of treatment abandonment in children from developing countries with cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 2007; 49:941-946.
  29. Armstrong GT, Liu Q, Yasui Y, et al. Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 2009; 27:2328-2338.

## Community resources support adherence to treatment for childhood cancer in El Salvador

**To cite this article: Nuria Rossell, Carmen Salaverria, Angelica Hernandez, Soad Alabi, Roberto Vasquez, Miguel Bonilla, Catherine G. Lam, Raul Ribeiro & Ria Reis (2018) Community resources support adherence to treatment for childhood cancer in El Salvador, *Journal of Psychosocial Oncology*, 36:3, 319-332, DOI: 10.1080/07347332.2018.1427174**

**To link to this article:** <https://doi.org/10.1080/07347332.2018.1427174>

Nuria Rossell , MSc<sup>a, b</sup> <http://orcid.org/0000-0002-2075-3267>

Carmen Salaverria, MSc<sup>b</sup>

Angelica Hernandez, RN<sup>b</sup>

Soad Alabi, MD<sup>b</sup>

Roberto Vasquez, MD<sup>b</sup>

Miguel Bonilla, MD<sup>c</sup>

Catherine G. Lam, MD<sup>c, d, e</sup>

Raul Ribeiro, MD<sup>d, e</sup>

Ria Reis, MSc, PhD<sup>a, f, g</sup>

<sup>a</sup>Amsterdam Institute for Social Science Research (AISSR), Amsterdam University, Amsterdam, The Netherlands; <sup>b</sup>Department of Oncology, Benjamin Bloom Hospital, San Salvador, El Salvador; <sup>c</sup>International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA; <sup>d</sup>Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA; <sup>e</sup>College of Medicine, University of Tennessee, Memphis, Tennessee, USA; <sup>f</sup>Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; <sup>g</sup>School of Child and Adolescent Health, University of Cape Town, The Children's Institute, Cape Town, South Africa.

## Abstract

**Objective.** In order to reduce nonadherence and treatment abandonment of children with cancer in El Salvador, institutions located nearby the patients' homes were involved to provide support. Methodological approach: Health clinics and municipality offices in the patients' communities were asked to assist families who were not promptly located after missing hospital appointments, or those whose financial limitations were likely to impede continuation of treatment. Data was collected about the number of contacted institutions, the nature of help provided, staff's time investments, and parents' perceptions about the intervention. Findings: Local institutions (133 from 206 contacts) conducted home visits (83), and/or provided parents with money (55) or transportation (60). Parents found this support essential for continuing the treatment but they also encountered challenges regarding local institutions' inconsistencies. Nonadherence and abandonment decreased.

**Implications.** Economic burden was reduced on both the families and the hospital. Involvement of external institutions might become regular practice to support families of children with cancer.

**Keywords:** abandonment of treatment; adherence; childhood cancer; community resources; developing countries; parents experiences.

## Background

Nonadherence to treatment is defined as an inadequate intake of prescribed medication or intermittent attendance at medical appointments, and this may affect cancer therapy outcomes by lowering the treatment efficacy and increasing the risk of relapse (Butow et al., 2010). In low- and middle-income countries (LMIC), treatment abandonment is a significant cause of failure of childhood cancer treatment (Arora, Eden, & Pizer, 2007; Howard, Pedrosa, & Lins, 2004; Spinetta, Masera, & Eden, 2002) and can be considered an extreme form of nonadherence (Sitaresmi, 2009). Both nonadherence

and treatment abandonment need to be addressed for children with cancer in less advantaged settings.

Based on a systematic review (Gupta, Yeh, & Martiniuk, 2013), the magnitude of reported abandonment varies widely, as much as from 0% to 74%, and interventions to reduce it have not been systematically reported, such that it is difficult to provide comparable examples for success or failure along the varied geographic and cultural regions where it occurs. Interventions to address abandonment encompass providing material aid, improving standards of care, and providing families with better information on disease and treatment (Howard, Ribeiro, & Pui, 2005; Spinetta et al., 2002). Specific examples include introducing a medication diary for children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Indonesia (Sitaresmi, Mostert, Gundy, Ismail, & Veerman, 2013) and providing extensive cancer and treatment information, along with assistance with transport expenses and other family needs, in Brazil and Central American countries (Howard et al., 2004; Howard et al., 2005; Rossell, Gigengack, & Blume, 2015). However, a cancer diagnosis also causes a family to lose income during hospital attendance and incur expenses not covered by institutional subsidies (Israels et al., 2008; Mostert, Gunawan, & Wolters, 2012; Tsimicalis, Stevens, Ungar, McKeever, & Greenberg, 2011). Aid provided in the community might positively influence parents' decision-making and their ability to attend their child's treatment.

Collaborative strategies involving multiple local institutions or resources in LMIC have not been well developed or documented. However, community resources, specifically nonprofessional health care workers, have been used successfully in constrained settings to supplement facility-based medical services, especially for mental health care and for preventing infant and maternal mortality (Haver, Brieger, Zoungrana, Ansari, & Kagoma, 2015; Selamu, Asher, & Hanlon, 2015). Even though cancer treatment cannot be referred to local clinics, similar strategies involving resources that are not necessarily health related can provide support for completing medical treatment.

## The Salvadoran childhood cancer program

In El Salvador, governmental resources do not cover the expenses of long-term care or treatment other than medicines and medical attention in national hospitals. Therefore, the support of non-governmental organizations (NGOs) is needed to guarantee a basic level of services for chronic diseases like childhood cancer. All children younger than 12 years who are newly diagnosed with cancer (approximately 200/year) receive free treatment, regardless of their socioeconomic status (SES), at the Benjamin Bloom National Pediatric Hospital, which is supported by two nonprofit groups: the Fundación Ayúdame a Vivir (FAV) [Help Me to Live Foundation] and the Asociación Salvadoreña de Padres y Amigos de Niños con Cáncer (ASAPAC) [Salvadoran Association of Parents and Friends of Children with Cancer].

Strategies to reduce abandonment in El Salvador have mostly targeted the psychosocial and financial needs of the families. Improved diagnostic communication procedures were based on a multidisciplinary team approach involving a nurse educator, psychologists, social workers, and a physician, leading to better informed parents and children (Rossell Curcó, 2001). Provisions for the poorest families include meals and accommodation for parents staying at the hospital with their child, money for transportation, payment for imaging and screening tests performed outside the hospital, food baskets for families returning home after a hospitalization, and payment of funeral expenses (Bonilla, Rossell, & Salaverria, 2009). The multidisciplinary team determines the kind and amount of assistance that a family receives based on the social worker's evaluation and team discussions in special cases. These interventions improved the quality of psychosocial services, and the rate of treatment abandonment decreased substantially from 22% in 1999

(Bonilla, Moreno, & Marina, 2000) to 13% over the past decade (Bonilla et al., 2009). In 2011, the introduction of the time sensitive adherence tracking procedure (TS-ATP) for patients who missed

hospital appointments, provided the first reliable data on treatment absenteeism in El Salvador and helped further reduce abandonment rates to 3% in the reported years of 2011 and 2012. The main reasons for missing appointments were (1) lack of funds; (2) unexpected events, such as weather conditions or transportation problems; and (3) circumstances related to family dynamics, such as another family member being ill or the primary caregiver having conflicting responsibilities (Salaverria, Rossell, & Hernandez, 2015).

The TS-ATP was a teamwork strategy linked to the patient's scheduling system: patients who missed appointments for treatment or medical checkup were detected and contacted on the same day of the absence. If contact failed, local institutions, such as health units and municipalities were asked to locate the families, and to help them, especially if their absenteeism was related to a lack of money or transport.

The process of early detection and reaction in the TS-ATP was possible due to an improved computer-based management of the steps involved in each child's hospital appointment. The appointment and the steps expected were programmed in advance in each clinical visit according to the treatment protocol, and the personnel involved in each step would carry out specific checks that allowed them to quickly detect when a child missed either an appointment or a step of the programed plan. Close follow-up of each absent child and the result of the contact were registered in a database (see Salaverria et al., 2015 for the detailed TS-ATP strategy). The success of the intervention resulted in the expansion of the contact with local institutions to include families at high risk of abandoning treatment (e.g., for a lack of financial resources), even if they had not missed hospital appointments.

Here we report our experience soliciting voluntary support from community institutions as an additional strategy to address and prevent absenteeism and treatment abandonment, and how parents experienced and perceived this intervention. The registered information and interview data on which this report is based has come out

of the continuing process of improvement and expansion of the TS-ATP strategy. By coming out from an ongoing intervention, this research resembles most closely action research (Berg & Lune, 2012), in particular due to the progressive systematization of data collection and the importance of reflexive analysis along the intervention.

## **Method**

This is a mixed-methods exploratory research in which we created a database recording patients' absences and the follow-up activities by hospital staff in regard to secure treatment continuation, and community institutions participation. Subsequently, we followed up with qualitative interviews with parents and staff members to provide insight into the tally of our database, especially in regard to the usefulness of community resources to prevent absenteeism and/or abandonment.

### **Setting and patients**

Most families who come to the Benjamin Bloom National Pediatric Hospital are poor, as one-third of the population of this country lives in poverty (World Bank, 2015). Data from the social worker's assessment of families' SES reveals that approximately 70% of families in the program survive on a monthly income of less than US\$50 from informal, temporary jobs. Families who earn up to the minimum wage (\$250) are 16%, and only 14% reach an income higher than that. Approximately half of the children come from rural areas.

On admission, the social worker, psychologist, and nurse educator assess the family's resources and general risk factors that could hinder the child's completing treatment. Besides the social worker's socioeconomic questionnaire (inquiring location and type of household, number of family members, breadwinning activities, average expenses, etc.), the psychologist and the nurse educator individually conduct interviews and assess the family while providing information from their area of expertise, which complements medical and

practical information for the functioning of the newly diagnosed families at the hospital. This interaction provides the team with a sense of the social risks and resources of the family, as well as personal and family attitudes toward the new condition they have to adapt to. Families identified as socially or economically vulnerable to the extent that treatment attendance is at risk receive special attention.

### **Contact with local community institutions**

To help locate missing patients and prevent absences of children with significant economic or other limitations, parents were offered the option of having hospital staff contact a local office in their community to request support. All the families accepted the offer. A psychologist or social worker contacted the local municipality offices or health units (local national clinics for primary health care within their designated area) by phone, if a child missed an appointment and could not be located promptly. The community institutions sent social or health promoters to visit the family at home, to help or encourage them to return to the hospital, and subsequently reported their findings to hospital personnel. Through follow-up phone calls or letters from the hospital, continuing help for the families was coordinated with the collaborating community institutions.

In the case of families identified as being socially or economically vulnerable (regardless of missing hospital appointments), contact with community institutions would take place through a letter sent to the parents. Personnel at these institutions were informed of the child's diagnosis, the importance of treatment, and the value of their voluntary support in enabling the child to continue treatment. The request for help was general and open to the available resources of each institution.

### **Data collection and sources of information**

The data presented here are drawn from a database that tracks patient absences and subsequent follow-up action. This report analyzes the data collected from January 2011 to December 2013. First, the database records interactions with the community institu-



tions, and contains entries on frequency of and reasons for children missing appointments, the number and type of community institutions contacted for help, their responses, and the type of help they provided.

Second, the database records follow-up contact with the families. For each missed appointment, members of the psychosocial team phoned the parents and asked the reason for their absence. Follow-up interviews were held at the hospital in cases where information by phone or previous contacts seemed insufficient, contradictory, or was not possible. The parents were asked the type of obstacles they had for attending treatment, main possible solutions at hand, chances for such obstacles to represent a regular problem for treatment adherence, etc.

In order to gain a better understanding of these obstacles and how follow-up might be improved, NR and CS conducted qualitative in-depth interviews with a select number of parents (17). During these interviews, parents were asked their opinions about the help received or their experience with the local institutions, which allowed us to get a better sense of the lived experience of the families assisted by these services. We include some of the stories told by the parents below.

In addition to these interviews, our analysis is guided by NR's participant observation of the multidisciplinary team activities, including staff procedures meetings and case discussions. Also, informal interviews with hospital staff were held to know their opinions and lessons learned from the handling of the inter-institutional relations and contacts, their view of the parents' involvement, and the main difficulties encountered in the inter-institutional exchanges. In short, the qualitative follow-up was meant to provide a better understanding of the strengths and weaknesses of this intervention, and its impact on parent's perceptions of, and engagement with, the treatment.

## Results

### Resources and mobilized support

During the 3-year period reported here, the hospital team contacted 118 community institutions to help 206 children: 110 health units or municipality offices, 7 local NGOs, and 1 church. Each territorial area (village or town) has municipal offices and health units that provide services within definite geographic limits. The institutions were contacted based on the correspondent territory to which each family belonged. Some institutions were contacted twice or more if more than one family happened to live in their area of influence. NGO's or churches were contacted if the parents reported to the hospital staff that such institutions ran relevant projects in their town.

In most cases, the community personnel showed interest and willingness to help the family, whether or not they actually followed through. No response or help was obtained in 73 cases (35%). Of those institutions that responded positively, 83 searched for absent patients, 60 transported parents to the hospital in institutional vehicles, 55 provided money for travel expenses, 7 provided food baskets, and 23 provided a one-time-only monetary aid. A total of 128 children (62%) benefited from this collaboration, resulting in an estimated expenditure of US\$27,700, or approximately US\$72 per child per year (this calculation considers only costs of transportation and travel expenses).

In the process of locating absent parents and the follow-up once they returned, 1,913 phone calls and 873 face-to-face interviews were conducted, enquiring parents about reasons for absences, and considering new more effective alternatives of help especially in cases of repetitive absences. The length of the interviews varied from 5 to more than 60 minutes, but most of them (87%) took less than half an hour.

## **Parents' challenges and experiences with support**

Despite the help received through community institutions, attending hospital appointments involved financial and nonfinancial costs beyond transportation, food, and lodging, so the practicalities of undergoing treatment still imposed some burden. However, the immediate benefit gained from solving a financial or practical difficulty made the whole effort seem worthwhile.

Parents provided with transportation arrived at the municipality office or other meeting point early in the morning. Those who received bus fare in cash had to phone or visit the community office to learn when they could obtain the money.

The families incorporated these procedures into their routines for attending treatment. The two main difficulties parents reported were irregularities in the local institutions' systems that resulted in a vehicle or money being unavailable, and lack or irregular access to the appropriate contact person. Parents often had to call or visit the office repeatedly to inquire about promised help, which depleted their phone credit or funds for public transport. On other occasions, parents were uncertain if local institutional help would be available until the last minute. In all cases, parents needed to coordinate home logistics in advance, for example, arranging food, household chores, or more complex matters, so that family activities could continue while the caregiver was at the hospital. In some cases, the need to coordinate logistics with the community institution in addition to the hospital required parents to modify their plans. For example, one mother explained that if the institutional vehicle was late arriving at the meeting point, she would set off for the hospital by bus to avoid being late and thereby delaying the treatment process until later that day. If that happened, she might stay in the hospital's temporary accommodation overnight rather than risk returning to her home in an unsafe area in the late afternoon or evening, but this precaution interfered with her domestic responsibilities, and her family worried if she could not notify them of her changed schedule.

Another mother stayed overnight with fellow church members who lived closer to the center of the municipality, so that she could leave for the hospital early in the morning without having to walk a long way through the forest in the dark. However, this required her to make arrangements at home 2 days before her child's appointment.

One father would visit the municipality every week on the day before his child's appointment to receive money for the bus. Occasionally, funds were unavailable and he had to borrow money from neighbors. Asking neighbors for small and frequent loans is common in El Salvador, but when parents counted on a secure source of financial assistance from a local institution, this unanticipated lack of funds added last-minute obstacles to attending their child's appointment. Some parents had no money other than that received from the local community institution, whereas others had small savings.

One father rejected an offer of municipal transportation because the vehicle was only available when other errands were run in the capital, requiring the father to adapt his trip to the driver's schedule and priorities. The father considered that he could not risk his child's scheduled treatment, despite greatly needing this support.

Overall, parents found the help from their local communities useful and, for some, even essential for attending their child's treatment. Parents were generally thankful, and most dismissed inconveniences as unimportant, assuming they were unavoidable. One mother said: *"Probably I wouldn't come [to the hospital] without this help. When they get delayed [providing her with bus fare], I bake and sell some bread and I travel with that money. I can't work every day because I have to be here [at the hospital] so often."*

The support was sometimes intermittent. George, a teenager whose leg was amputated, travels to the hospital approximately 12 times a month by taxi, which costs \$24, a sum his mother cannot afford. The day before each appointment, his mother calls the municipality for assistance, but institutional transport is frequently unavailable: *"...at the end, calling is useless because most of the times they*

*can't take me to the hospital. Sometimes, I have to wait long before they come to pick me up, but I do not complain because they are not obligated to do this; I call them because I have need of their help."*

In contrast, Francis' mother is highly satisfied with the help offered by her municipality. She lives in a village 2 hours from the hospital. Francis is an 11-yearold with a brain tumor that impairs his walking, and he sometimes uses a wheelchair. *"Only twice they [the municipality] could not take us to the hospital. Once I called the driver the day before [the appointment] and he confirmed that he would pick us up at home at 4:00 am, as usual. Right after he called back and said that the car had no gasoline left, I managed to tell some friends the problem and I collected \$20.00 from them. With that we traveled by bus. The social worker at the hospital gave me \$5.00 to help me to return home. I haven't missed one single appointment in the whole year."*

### **The psychosocial team's experience**

The repeated exchanges between hospital personnel and local community institutions enhanced collaboration, provided local personnel with information about childhood cancer and the importance of treatment adherence, and increased awareness of the parties involved about how the community institutions and the oncology team provided their respective services. According to the perception of the hospital staff, the personal interest and professional skills of particular community functionaries made the help more efficient for families, and likewise, uninterested individuals were more difficult to work with, and their provision of help was less reliable.

Either the social worker, nurse, or psychologist would take up the role of contacting third-party institutions, and usually they would follow a case from beginning to end to avoid unnecessary reupdating. Because the appointment frequency varies according to the child's diagnosis, it was difficult for the hospital team to have up-to-date information about the continuity of institutional help and to track each child on a frequent basis. Case monitoring was done mainly when parents reported issues requiring institutional fo-

llow-up, particularly when the parents were receiving support on a more or less regular basis but irregularities were becoming too frequent. The hospital staff would call and inquire about the situation, and try to establish whether something could be done on the part of the hospital, like, in some cases, reconsidering a treatment schedule to coincide with the community institution availability of transport. The inter-institutional follow-up was difficult and time-consuming because usually it would take several calls and messages to locate the responsible functionary in the offices, or the functionaries would have limited decision maneuver and it would require a balance of gentle but constant pressure to get things solved.

## **Discussion**

This article describes a strategy to avoid or diminish nonadherence to treatment appointments for children with cancer by soliciting the participation of community institutions. Implementing the TS-ATP and community institution support reduced the incidence of treatment abandonment from 13% to 3%. (Salaverría et al., 2015) Although the precise contribution of using community resources to lowering the rate of abandonment is unknown, the initiative provided resources for those families with the most need without increasing the economic stress on the cancer support organizations. Parents found this support essential for their child's treatment but also encountered challenges in making the procedure work amid irregularities.

This initiative originated in the hospital team's experience and understanding of the situation of the families and stimulated efforts to mobilize community institutional support. For the hospital staff, the benefits outweighed the extra time spent tracking and monitoring children outside the hospital. As a strategy to address absences and abandonment, this initiative provided families with valuable material resources but the element of unreliability further complicated the already difficult lives of some parents. How a family perceives the costs and benefits of relying on community institutions' help may affect the risk of nonadherence and abandonment.

## **Financial scarcity as key constraint for families and institutions**

Initiatives in several countries show that improving families' material conditions helps reduce abandonment (Howard et al., 2004). As in other countries, (Suarez, Piña, & Nichols-Vinueza, 2015) financial issues were the main reason for nonadherence to appointments in our group of parents. The financial burden of a cancer diagnosis includes not only the cost of specialized medicines and frequent hospital visits but also the depletion of resources for family sustenance and reduced income through missed work (Israels et al., 2008; Mostert et al., 2012; Tsimicalis et al., 2011). The cost of transportation to the hospital substantially affects family finances, particularly for those living far away (Fluchel, Kirchhoff, & Bodson, 2014; Wakefield et al., 2014). Therefore, transportation assistance from community institutions addresses the most frequent cause of nonadherence to appointments for cancer treatment.

Hospitals and foundations in LMIC have scarce resources to meet even basic standards of care by providing additional medicine and medical personnel, and the extra help that families need to complete treatment represents a significant burden for local cancer support programs. In such circumstances, a resource-poor program that must cover families' needs beyond their children's treatment requires creativity and commitment.

## **Individual experiences illustrate complexity of financial limitations**

Although the parents recognized their local community's help as essential, a few found the uncertainty of the support annoying and disruptive. Therefore, what the hospital team saw as a general solution for families at risk for nonadherence was seen by some parents as a new source of difficulty requiring them to deal with yet another institution, as what started as an arrangement between institutional representatives had to be subsequently handled by the parents.

Parents with financial alternatives or more resources were less willing to accommodate the conditions of community institutional support to receive help. This shows that people value their autonomy in decisions about the use of their time and money, even when there is little room for maneuver. Parental decisions that appear wrong, impractical, or lacking in priority setting might actually signify a perceived lack of reliability of resources or weak governance at community institutional levels. Most parents could navigate a certain level of uncertainty when facing the precarious nature of community institutional support. However, the hospital team must continue to monitor the relationship between parents and community institutions and evaluate whether the support is successful or if failures could become a new reason or justification for nonadherence or abandonment.

### **Value of team effort and community resources**

Our previous findings regarding this intervention do not suggest that nonadherence per se leads to abandonment (Salaverría et al., 2015). Rather, the pathway to abandonment may involve other routes, and nonadherence does not usually signify abandonment unless the motive is solely material scarcity. In cases of severe financial difficulties, starting interventions after the first missed appointment will likely help the parents to not abandon treatment of their child, even if they continue to miss appointments sporadically. Most parents with a history of many absences will apparently continue coming as best they can; they do not doubt the efficacy of the treatment, nor do they intend to ultimately abandon it. This represents a primary incentive for providing economic relief to families as a first step toward tackling abandonment. In more complex situations, where financial issues are only part of the motivation for abandonment, an individualized approach by the psychosocial team and a good relationship between the health team and the parent may provide a better basis for reducing the number of absences and the chance of abandonment.

Cultural sensitivity and appropriate interpretation of, and respect for, families' needs are essential for the best healthcare team—



family relationship. Cultural considerations and spiritual beliefs in pediatric cancer treatment are studied increasingly in the face of multicultural scenarios for health care provision (Wiener, Mcconnell, Latella, & Ludi, 2013). It is equally relevant to consider how social class, schooling, and the urban-rural divide play a role in shaping doctor-parents relationships. Taking into account the socio-cultural circumstances and resources of the families is essential, particularly in settings where socioeconomic aspects play a crucial role in decision-making processes in health and other aspects of family life.

A steady, coordinated effort was a key element in the successful outcomes of inter-institutional collaborations reported here. Also essential was the experiential knowledge of the psychosocial team, facilitating balanced interpretation of parent interviews, coordination of multiple perspectives to better understand needs and allocate help, coordination with community institutions, and follow-up and registration of each case. Through their participation, local institutions became aware of the families' situation and the optimistic outcomes for childhood cancer treatment in the country.

Such a collaborative effort may be applied to reduce treatment abandonment in other countries; however, fundamental conditions must be present, such as access to phone lines to reach parents and institutions. In countries with less efficient road and communication networks or which lack suitably interconnected levels of attention within the health system, establishing inter-institutional collaborations can be challenging.

Our intervention was circumscribed to material resources provided to families by local community institutions. However, these institutions, together with other local resources, might create collective support, not limited to financial aid, for families struggling with a child with cancer. If promoted or encouraged, this more comprehensive support will likely counteract feelings of hopelessness and reduce the incidence of abandonment. Implementing and evaluating such collaboration is challenging but could provide important lessons for managing childhood cancer and other health issues in constrained settings.

Standardized screening facilitates comprehensive attention for psychosocial needs of families of children with cancer (Kazak, Barakat, & Hwang, 2011). However, screening tools do not have indiscriminate use, and applicability and results, have serious validation issues beyond the population in which such instruments have been developed. Although such instruments are not part of the clinical practice in El Salvadoran cancer program, this report shows the relevant impact that systematization of data collection and the analysis of clinical interventions can have on the improvement of services for the families.

Further improvements of this intervention include optimizing the psychosocial data collection, and its use for quantitative and qualitative analysis of the results. The Salvadoran program is integrating information on psychosocial data and inter-institutional collaborations for each patient into a computerized system. This will facilitate the follow-up and analysis of individual cases, keeping personalized clinical interventions, and expanding possibilities for research. This system will serve as a tool tailored to the psychosocial needs and circumstances of the El Salvadoran program.

Feedback from the community institutions was not collected. Implementing strategies to hear feedback about the collaborative relationship might help to improve ongoing and future interventions and could initiate a path toward formalizing relationships between the institutions involved. Moreover, in order to enhance its impact and proper documentation, this experience opens up the possibility of following up with an intervention research approach, in particular through Community-Based Participatory Research, which, by drawing on the active participation and perspective of the parents and the institutional functionaries, could expand our comprehension of the elements that are important to consider when trying to understand and combat absenteeism.

## **Limitations**

The intervention was conducted in the sole childhood cancer treatment center in a small Central American country, precluding

generalizations about the results. However, from the literature regarding treatment adherence and abandonment in LMIC, we have identified commonalities in family challenges, and our report will, therefore, likely be helpful to others. Another limitation is the participation of multiple hospital professionals who gathered information without a standardized collection tool. Therefore, these should be considered pilot data; future data collection will be more comprehensive and systematic.

## **Conclusion**

By using a committed team and basic resources for communication, a hospital can reach a family's community and help parents continue their child's treatment by assembling the necessary resources. The participation of community institutions brought financial relief to both the families and the cancer program and allowed the children to continue treatment.

The parents' experiences as resource beneficiaries at the center of inter-institutional efforts must be considered when strategizing how to streamline the procedure. Where institutional organization is frail, individual contact and a more personalized approach can foster goodwill as a starting point for allocating limited resources efficiently. Creating stronger links among local institutions, the hospital, and foundations, and optimizing the terms of collaboration should be future aims of this intervention with multicenter participation.

Further progress can be achieved by developing guidelines for this type of inter-institutional collaboration, in order to reduce the uncertainty of support, maximize resource provision, and minimize the burden on the families. General guidelines could include a categorization of the types of assistance or contributions expected from the participating institutions, and, at an operational level, for those who are in direct contact with the families in their communities, the identification of events that should be followed up by case updates among institutions.

Our experience shows that a process that integrates a robust appointment tracking system, an immediate response to absences, and resources from community institutions to enable treatment adherence can be implemented at relatively low cost to reduce treatment abandonment in LMIC. The possibilities for advocating a formal systematic collaboration involving diverse institutions of private and government sectors should be considered.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict to declare.

**Acknowledgments.** We thank Keith Laycock for expert scientific review. The Brocher Foundation provided a four months writing fellowship during partial period of the preparation of this manuscript.

## References

1. Arora, R., Eden, T., & Pizer, B. (2007). The problem of treatment abandonment in children from developing countries with cancer. *Pediatric Blood & Cancer*, 49, 941–946. doi.org/ 10.1002/pbc.21127
2. Berg, B. L., & Lune, H. (2012). *Qualitative research methods for the social sciences* (8th ed.). Boston:Pearson Education
3. Bonilla, M., Moreno, N., Marina, N., et al. (2000). Acute lymphoblastic leukemia in a developing country: Preliminary results of a nonrandomized clinical trial in El Salvador. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 22(6), 495–501. doi.org/10.1097/00043426-200011000-00004
4. Bonilla, M., Rossell, N., Salaverria, C., et al. (2009). Prevalence and predictors of abandonment of therapy among children with cancer in El Salvador. *International Journal of Cancer*, 125, 2144 – 146. doi.org/10.1002/ijc.24534
5. Butow, P., Palmer, S., Pai, A., Goodenough, B., Lockett, T., & King, M. (2010). Review of adherence- related issues in adoles-

- cents and young adults with cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(32), 4800–4809. doi.org/10.1200/JCO.2009.22.2802
6. Fluchel, M. N., Kirchoff, A. C., Bodson, J., et al. (2014). Geography and the burden of care in pediatric cancers. *Pediatric Blood & Cancer*, 61(11), 1918–1924. doi.org/10.1002/pbc.25170
  7. Gupta, S., Yeh, S., Martiniuk, A., et al. (2013). The magnitude and predictors of abandonment of therapy in paediatric acute leukaemia in middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 49(11), 2555–2564. doi.org/10.1016/j.ejca.2013.03.024
  8. Haver, J., Brieger, W., Zoungrana, J., Ansari, N., & Kagoma, J. (2015). Experiences engaging community health workers to provide maternal and newborn health services: Implementation of four programs. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 130, S32–S39. doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.03.006
  9. Howard, S. C., Pedrosa, M., Lins, M., et al. (2004). Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. *JAMA*, 291(20), 2471–2475. doi.org/10.1001/jama.291.20.2471
  10. Howard, S. C., Ribeiro, R. C., & Pui, C. (2005). Strategies to improve outcomes of children with cancer in low-income countries. *European Journal of Cancer*, 41(11), 1584–1587. doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.020
  11. Israels, T., Chirambo, C., Caron, H., de Kraker, J., Molyneux, E., & Reis, R. (2008). The guardians' perspective on paediatric cancer treatment in Malawi and factors affecting adherence. *Pediatric Blood & Cancer*, 51, 639–642. doi.org/10.1002/pbc.21703
  12. Kazak, A. E., Barakat, L. P., Hwang, W., et al. (2011). Association of psychosocial risk screening in pediatric cancer with psycho-

- social services provided. *Psychooncology*, 20(7), 715. doi.org/10.1002/pon.1972
13. Mostert, S., Gunawan, S., Wolters, E., et al. (2012). Socio-economic status plays important roles in childhood cancer treatment outcome in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(12), 6491–6496. doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.12.6491
  14. Rossell Curcó, N. (2001). El cáncer infantil en El Salvador: Programa de atención integral y adaptación escolar. Colección Aportes, 13. Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales FLACSO Programa El Salvador.
  15. Rossell, N., Gigengack, R., & Blume, S. (2015). Childhood cancer in El Salvador: A preliminary exploration of parental concerns in the abandonment of treatment. *European Journal of Oncology Nursing*, 19, 370–375. doi.org/10.1016/j.ejon.2015.01.005
  16. Salaverria, C., Rossell, N., Hernandez, A., et al. (2015). Interventions targeting absences increase adherence and reduce abandonment of childhood cancer treatment in El Salvador. *Pediatric Blood Cancer*, 62(9), 1609–1615. doi.org/10.1002/pbc.25557
  17. Selamu, M., Asher, L., Hanlon, C., et al. (2015). Beyond the biomedical: Community resources for mental health care in rural Ethiopia. *PloS One*, 10(5), e0126666. doi.org/10.1371/journal.pone.0126666
  18. Sitaresmi, M. N. (2009). Non-compliance with childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in Indonesia. Amsterdam: Vrije Universiteit
  19. Sitaresmi, M. N., Mostert, S., Gundy, C. M., Ismail, D., & Veerman, A. J. P. (2013). A medication diary-book for pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia in Indonesia. Pe-

- diatric Blood & Cancer, 60(10), 1593–1597. doi.org/10.1002/pbc.24570
20. Spinetta, J., Masera, G., Eden, T., et al. (2002). Refusal, noncompliance, and abandonment of treatment in children and adolescents with cancer. A report of the SIOP working committee on psychosocial issues in pediatric oncology. *Medical and Pediatric Oncology*, 38(2), 114–117. doi.org/10.1002/mpo.1283
  21. Suarez, A., Piña, M., Nichols-Vinueza, D. X., et al. (2015). A strategy to improve treatment-related mortality and abandonment of therapy for childhood ALL in a developing country reveals the impact of treatment delays. *Pediatric Blood & Cancer*, 62(8), 1395–1402. doi.org/10.1002/pbc.25510
  22. Tsimicalis, A., Stevens, B., Ungar, W., Mckeever, P., & Greenberg, M. (2011). The cost of childhood cancer from the family's perspective: A critical review. *Pediatric Blood & Cancer*, 56(5), 707–717. doi.org/10.1002/pbc.22685
  23. Wakefield, C. E., Mcloone, J. K., Evans, N. T., Ellis, S. J., & Cohn, R. J. (2014). It's more than dollars and cents: The impact of childhood cancer on parents' occupational and financial health. *Journal of Psychosocial Oncology*, 32(5), 602–621. doi.org/10.1080/07347332.2014.936653
  24. Wiener, L., McConnell, D., Latella, L., & Ludi, E. (2013). Cultural and religious considerations in pediatric palliative care. *Palliative & Supportive Care*, 11(1), 47–67. doi.org/10.1017/S1478951511001027
  25. World Bank. (2015). El salvador. Data Web site. Retrieved from <http://data.worldbank.org/country/el-salvador>. Updated

## Anaplastic Large Cell Lymphoma in Central America: A Report From the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA)

Francesco Ceppi, MD<sup>1\*</sup>; Roberta Ortiz, MD<sup>2</sup>; Federico Antillón, MD<sup>3</sup>; Roberto Vasquez, MD<sup>4</sup>; Wendy Gomez, MD<sup>5</sup>; Jessica Gamboa, MD<sup>6</sup>; Claudia Garrido, MD<sup>3</sup>; Guillermo Chantada, MD<sup>7,8</sup>; Armando Peña, MD<sup>9</sup>; and Sumit Gupta, MD, PhD<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children and University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; <sup>2</sup>Department of Pediatric Oncology, Manuel de Jesus Rivera Hospital, Managua, Nicaragua; <sup>3</sup>National Pediatric Oncology Unit, Francisco Marroquín Medical School, Guatemala City, Guatemala; <sup>4</sup>Department of Onco-Hematology, Hospital Benjamin Bloom, San Salvador, El Salvador; <sup>5</sup>Department of Hematology-Oncology, Dr. Robert Reid Cabral Children's Hospital, Santo Domingo, Dominican Republic; <sup>6</sup>Department of Hematology-Oncology, Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Saenz Herrera", San José, Costa Rica; <sup>7</sup>Department of Hematooncology, Hospital JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina; <sup>8</sup>International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; <sup>9</sup>Department of Pediatric Hemato-Oncology, Hospital Escuela-Universitario, Tegucigalpa, Honduras

**Correspondence to:** Francesco Ceppi, Division of Haematology/ Oncology, The Hospital for Sick Children and University of Toronto, 555 University Ave, Toronto, Ontario, Canada M5G 1X8. E-mail: francesco.ceppi@sickkids.ca

© 2015 Wiley Periodicals, Inc. DOI 10.1002/pbc.25698. Published online 8 August 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)



**Background.** Although anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is curable in high-income countries (HIC), data from low- and middle-income countries (LMIC) are lacking. We therefore conducted a retrospective study of the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA) experience in treating ALCL.

**Procedure.** We included all patients age <18 years newly diagnosed with ALCL treated between 2000 and 2013 in seven AHOPCA institutions. Retrospective data were extracted from the Pediatric Oncology Network Database.

**Results.** Thirty-one patients met inclusion criteria. Twenty-five (81%) had advanced disease (stages III and IV), six (19%) were treated on the APO (doxorubicin, prednisone, vincristine) regimen, 15 (49%) on multiagent chemotherapy designed for T-cell lineage malignancies (GuatALCL protocol), and 10 (32%) on BFM-based treatment regimens. Five-year overall event-free survival and overall survival were, respectively,  $67.1 \pm 8.6\%$  and  $66.7 \pm 8.7\%$ . All 10 events occurred in patients treated on BFM-based treatment regimens or the GuatALCL protocol, none on APO treatment: two patients experienced relapse, six treatment related mortality (TRM), and two abandonment.

**Conclusions.** Treatment of ALCL in countries with limited resources is feasible with similar outcomes as in HIC, though the causes of treatment failure differ. Less intensive regimens may be preferable in order to decrease TRM and improve outcomes. Prospective clinical trials determining the ideal treatment for LMIC children with ALCL are necessary. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63:78–82. ©Wiley Periodicals, Inc.

## Introduction

Anaplastic large-cell lymphoma (ALCL), a type of T-cell lymphoma, is a rare disease in children that represents 10–15% of pediatric non-Hodgkin's lymphomas (NHL). [1] First recognized in 1985,[2] its definition has recently been refined by extensive clinical, immunophenotypic, and molecular studies.[3]

There is still no consensus regarding the standard treatment for ALCL. Most European pediatric oncology groups have used short-pulse chemotherapy regimens based on mature B-cell NHL strategies, including high-dose methotrexate (MTX), cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and corticosteroids with a duration of 4–6 months.[4–8] In North America, patients with ALCL receive prolonged repeated-pulse chemotherapy, with doxorubicin, vincristine, steroids and maintenance with MTX, steroids and 6-mercaptopurine (APO-regimen)[9,10] or in the past with therapy similar to that for T lymphoblastic lymphoma/leukemia (3-week induction therapy followed by a 3-week consolidation period and six courses of maintenance chemotherapy at 7-week intervals).[11] The failure rate at 2 years remains at 30% for most of these regimens.

In 1998, five Central American countries formed the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA), with the goals of investigating disease behavior, developing treatment protocols, and establishing common public health initiatives. [12–14] Initially this consisted of Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, and Costa Rica. Panama joined in 2001 and the Dominican Republic in 2006. In this context it has been possible to design and conduct collaborative studies, and to institute a prospective clinical registry. [13, 15]

Currently, AHOPCA centers use either APO, GuatALCL, or European-based treatment regimens for pediatric ALCL. The last was due in part to international collaboration with several European institutions. [16] Given the different impact of treatment-related mortality in low- and middle-income countries (LMIC) [17, 18] and the lack of any data on ALCL in LMIC, we conducted a retrospective study of the AHOPCA experience in treating ALCL. Our objective was to report the outcomes of ALCL treatment in Central America and the toxicities according to the protocol employed (APO regimen, a compressed aggressive multi-agent Tcell lineage chemotherapy regimen [GuatALCL] vs. European approach).

## Method

### Study Population and Setting

In this population-based retrospective cohort study, the patient sample consisted of children diagnosed with ALCL and treated in any of the following seven AHOPCA institutions: Benjamin Bloom National Children's Hospital, San Salvador, El Salvador; the National Pediatric Oncology Unit, Guatemala City, Guatemala; Children's Hospital Robert Reid Cabral, Santo Domingo, Dominican Republic; Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera," San José, Costa Rica; Hospital de Manuel de Jesús Rivera "La Mascota," Managua, Nicaragua; Hospital Escuela-Universitario, Tegucigalpa and Hospital Mario Catarino Rivas, San Pedro Sula, Honduras. These sites represent the only pediatric oncology treatment centers in their respective countries.

We included patients aged 0–18 years at diagnosis with de novo ALCL who were diagnosed between January 1, 2000 and December 31, 2013. Immunohistochemical confirmation of diagnosis was attempted using positivity for CD30 and/or ALK protein. CD30 detection was available locally at each center with the exception of Honduras and Nicaragua. When possible, external confirmation of the ALCL diagnosis was obtained through review at the Pathology Department of St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA).

Cotrimoxazole prophylaxis against pneumocystis pneumonia infection was used for the majority of patients; no other prophylactic was used. Broad-spectrum intravenous antibiotics were started in children with febrile neutropenia. The choice of antibiotics depended on local antimicrobial resistance patterns, available antimicrobials, and cost. All seven centers broadened antibiotics in case of hemodynamic instability and initiated antifungal coverage in patients with prolonged fever. In all seven centers intensive care units with mechanical ventilation and ionotropic support were available. Blood banking practices and availability of blood products varied among centers. El Salvador, Costa Rica, Nicaragua, Dominican Republic,

and Honduras had blood banks available on site, whereas the center in Guatemala was supported by an off-site, private blood bank.

## **Data Sources**

Data were extracted from the Pediatric Oncology Network Database (POND) ([www.pond4kids.org](http://www.pond4kids.org)). POND is a secure, webbased, multilingual pediatric hematology/oncology database created for use in countries with limited resources to meet various clinical data management needs including cancer registration, delivery of protocol-based care, outcome evaluation, and assessment of psychosocial support programs. [19] Although data collection is primarily to assist in patient outcome monitoring and quality improvement initiatives, data can also be anonymized for research purposes.

In AHOPCA centers, data managers abstract information from patient charts in real time to enter into POND. Treating oncologists confirm data. Routinely collected information includes data on patient demographics, socioeconomic status, diagnosis, treatment, complications, and outcomes. An audit of POND data quality in Honduras showed that accuracy for basic data fields was 99%. [20]

## **Treatment**

Patients with ALCL were treated according to either APO, [9] GuatALCL, [11] or European-based treatment regimens for pediatric ALCL. [4]

The compressed aggressive multi-agent chemotherapy designed for T-cell lineage malignancies; GuatALCL (Supplemental Table I) was based on the CCG-5841 protocol. [11] European-based treatment regimens in use during the study period included the AHOPCA NHL-B protocol, based on the BFM treatment strategy (Supplemental Table II course A-B-A for stages I and II, courses A-B-A-B-A-BA for stage III, and courses AA-BB-AA-BB-AA-BB-AA for stage IV); HD-MTX doses were 1 and 3 g/m<sup>2</sup>/dose over 3 hr for cycle A and AA, respectively; in cycle A the ifosfamide doses were reduced

to 400 mg/m<sup>2</sup>/dose from 800mg/m<sup>2</sup>/dose. Other European based treatments were the AIEOP LNH-97 protocol [21] or NHL BFM-90 protocol. [5] The APO protocol used was based on the standard arm of Pediatric Oncology Group protocol POG-9315 (Supplemental Table III Induction and 15 cycles of maintenance). [9]

## Data Variables

Biologic variables included demographic features, such as age and sex, and disease-related features, such as stage, central nervous system status, and bone marrow evaluation. For the calculation of event-free survival (EFS) and overall survival (OS), date of event, date of death, and date of last contact were collected. Cause of death was subdivided into specific causes: infection, bleeding, disease progression, and other causes. The treating clinician determined the cause of death. The determination of events including relapse and progression was left to the local clinical team, as was therefore the need for a biopsy or a specific imaging modality, weighing clinical suspicion, imaging results, and safety. Both ultrasonography and computerized tomography were available in all centers. Abandonment of therapy was defined as 4 weeks of missed appointments during active treatment. Although the length of abandonment considered clinically significant varies between malignancies, a length of 4 weeks has been accepted previously in order to allow comparisons across protocols. [22]

## Statistical Methods

OS was defined as the time from diagnosis to death, with patients censored at the time of abandonment. EFS was calculated as the time from diagnosis to first event, with events comprising relapse, death, disease progression, or abandonment of therapy. EFS was also described with patients censored at the time of abandonment. Survival curves were computed using the Kaplan–Meier method. [23] Predictors of EFS and OS were determined using the log-rank test and Cox proportional hazard regression. Of note, given the limited sample size, analyses determining predictors of outcome were considered exploratory and hypothesis-generating only. Statistical analyses were per-

formed using SAS-PC software (version 9.3; SAS Institute, Cary, NC). Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ . The study was approved by the research ethics boards at The Hospital for Sick Children in Toronto, Canada and at each of the Central American sites.

## Results

The study sample included 31 children with ALCL treated in the six AHOPCA countries between 2000 and 2013.

Demographic characteristics of the patient population can be seen in Table I. Median age at diagnosis was 9.8 years (interquartile range [IQR] 5.8–13.8 years). Most patients (25, 80.7%) had advanced disease (stages III and IV). Immunohistochemical confirmation of the ALCL diagnosis was obtained in 30/31 (97%) patients. Of the 31 patients, 21 (67.7%) are alive, eight (25.8%) are dead, and two (6.5%) abandoned therapy. Of the 31 patients, six (19.4%) were treated on the APO regimen, 15 (48.4%) on the GuatALCL, and 10 (32.2%) on the European-based treatment regimens (four on the AHOPCA NHL B protocol, four on AIEOP LNH-97, and two on NHL BFM-90).

**Table 1.** *Patients Characteristics*

No. of patients (N ¼ 31) %		
Gender		
Male	17	54.8
Female	14	45.2
Stage		
II	6	19.4
III	19	61.3
IV	6	19.3
CNS		
Positive	4	12.9
Negative	25	80.6
Unknown	2	6.5
Bone marrow infiltration		
No	27	87.1
Yes	3	9.7
Unknown	1	3.2
Pathology review		
Internal	17	54.8
External	14	45.2
Country		
El Salvador	3	9.7
Nicaragua	4	12.9
Dominican R.	5	16.1
Guatemala	12	38.7
Honduras	3	9.7
Costa Rica	4	12.9
Treatment protocol		
NHL B AHOPCA	4	12.9
GuatALCL	15	48.4
APO	6	19.3
AIEOP LNH-97	4	12.9
NHL BFM-90	2	6.5

CNS, central nervous system; NHL, non-Hodgkin lymphoma; AHOPCA, Central American Association of Pediatric Hematology Oncology; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; AIEOP, Pediatric Haemato-Oncology Italian Association; BFM, Berlin-Frankfurt- M€unster.

Considering treatment abandonment as an event, 5-year overall EFS and OS were, respectively,  $67.1 \pm 8.6\%$  and  $66.7 \pm 8.7\%$  (Fig. 1). When patients were censored at the moment of treatment abandonment, overall 5-year EFS and OS were  $72.7 \pm 8.3\%$  and  $72.3 \pm 8.4\%$ .

The median follow-up was 26 months (IQR 4.8–55.9 months). Five-year EFS (patients censored at abandonment) in patients with localized disease was 100% (n=6) compared to 66.19.9% (n=25) in advanced disease (P=0.13). Five-year EFS (patients censored at abandonment) in patients for whom the pathology was reviewed externally was  $83.9 \pm 10.5\%$  (n=14) compared to  $63.5 \pm 12\%$  (n=17) for those only internally reviewed (P=0.19). Of the six patients treated according to the APO regimen, five (83.3%) had advanced stage disease whereas one had Stage 2 disease. The 5-year EFS for these six patients was 100%.

Six events occurred in patients treated on European-based treatment regimens: one patient experienced relapse, four TRM (three infection and one bleeding), and one abandonment. Four events occurred in GuatALCL protocol: three TRM (two infection and one other cause) and one abandonment.

## Discussion

We conducted a retrospective study of children with ALCL in six Central American countries treated by the collaborative group AHOPCA. Our results show that the treatment of pediatric ALCL is feasible in LMIC with outcomes equivalent to those in HIC. To our knowledge, this study represents the first report of pediatric ALCL from resource-constrained countries.

Interestingly, the EFS of our Central American population (67.18.6%) does not differ substantially from ALCL cohorts in HIC, the EFS of which have ranged from 71 to 76%. [7,8,10] However, the cause of treatment failure differed significantly. In our population, the main cause of treatment failure was toxicity, unlike in HIC, whe-



re relapses predominate. Increased rates of TRM have been well described in other pediatric malignancies both in Central America and in other LMICs.[17,24–29] As a consequence, and again differently from HIC populations, the EFS of our cohort was very similar to the OS (67.18.6% vs. 66.78.7%).

HIC centers have generally followed one of three ALCL treatment strategies. In one, children with ALCL are treated with BFM-based regimens designed initially for B-cell non-Hodgkin lymphomas.[4] In the second, used mainly in the past, children are treated with compressed aggressive multiagent T-cell lineage chemotherapy regimen, as CCG-5841 protocol.[11] In the third, children are treated with lower intensity chemotherapy cycles but for a longer total duration, as exemplified by the Children's Oncology Group (COG) APO regimen.[10] In HIC centers, these have resulted in equivalent outcomes.[7,10,11] Given the higher burden of TRM, the same may not hold true in LMIC populations. In our study, all events, including all cases of TRM, occurred in children receiving high-intensity BFM-based treatment regimens or intensive GuatALCL protocol. Although we are unable to draw firm conclusions given our small numbers, lower-intensity APO-based regimens warrant further prospective study in LMIC settings. It should be noted that one advantage of BFM-based studies and GuatALCL is their effectiveness in other non-Hodgkin lymphomas. This may be of particular importance in settings where immunohistochemistry and molecular studies for the ALK mutation are unavailable, making it difficult to distinguish ALCL from entities such as diffuse large B-cell lymphomas.

Single agent vinblastine has shown effectiveness in the relapse setting for children with ALCL.[30,31] Although vinblastine holds significant theoretical promise in LMIC, its effectiveness as a front line agent remains unproven,[30,31] and data about toxicity in LMIC populations are lacking. Targeted agents such as brentuximab vedotin, an antibody-drug conjugate combining an anti-CD30 antibody with a potent microtubule inhibitor, and crizotinib, a small molecule inhibitor of the ALK tyrosine kinase, appear to be very promising in

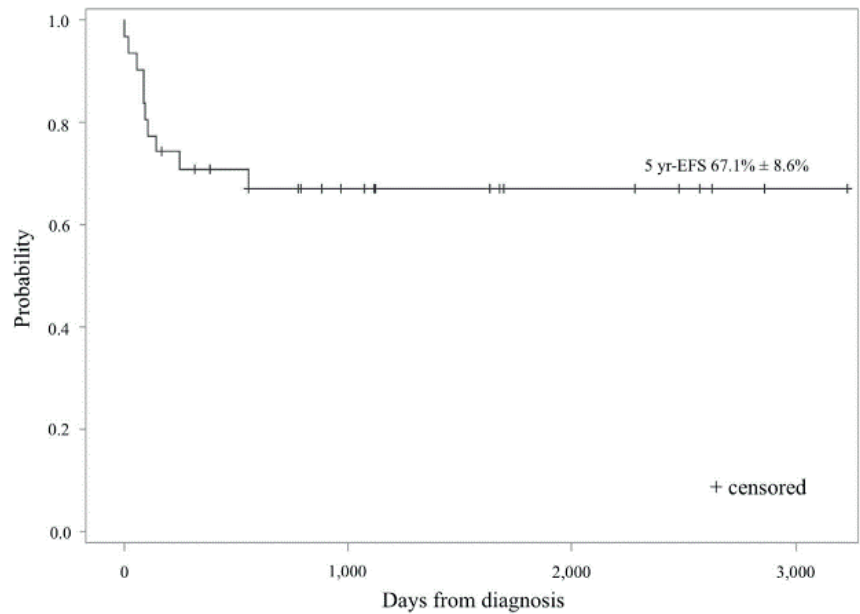
terms of efficacy and safety;[32–34] but their employment in LMICs is limited by availability and cost.

Indeed, our results confirm the need for setting-specific treatment strategies that take into account local realities. Such strategies are likely to differ between HIC and LMIC, and may in fact vary among LMIC. Our results also support international collaborative efforts like those of the International Society of Paediatric Oncology (with the committee Paediatric Oncology in Developing Countries) to create setting-adapted clinical treatment guidelines for the management of children with cancer.[35–39] Our results also illustrate the importance of accurate data and outcome monitoring of both overall outcomes and cause of treatment failure in order to inform such efforts.

Three main study limitations merit mention. First, the rarity of ALCL resulted in a small number of eligible patients, even over seven centers and 13 years. We therefore lacked sufficient power to draw definitive conclusions regarding risk factors within our cohort, including the impact of treatment protocol. Second, certain centers used European-based treatment strategies or GuatALCL whereas others used APO-based regimens. We therefore cannot rule out a confounding effect of treatment center when comparing treatment protocols. Third, our study suffers from the limitations inherent to all retrospective cohort studies, where some clinically important details may be unavailable. Despite these limitations, our study represents the first population-based investigation of LMIC pediatric ALCL. Our results can therefore be used as a basis for the design and implementation of prospective trials in this population.

In summary, the treatment of ALCL in countries with limited resources is feasible with similar outcome as HIC. Less intensive regimens, such as APO-based treatment, may be preferable to more intensive chemotherapy regimens given high rates of TRM in LMIC, particularly in settings with access to accurate and timely diagnostic capabilities. Prospective clinical trials are necessary in LMIC to improve the outcome of children with ALCL and validate our results.

**Figure 1.** Event-free survival (EFS) with abandonment considered as an event



## References

1. Wright D, McKeever P, Carter R. Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: Findings from the UK Children's Cancer Study Group. *J Clin Pathol* 1997; 50:128–134.
2. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Palleisen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K. The expression of the hodgekin's disease associated antigen ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: Evidence that reed-sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66:848–858.
3. Damm-Welk C, Klapper W, Oschlies I, Gesk S, Rottgers S, Bradtke J, Siebert R, Reiter A, Woessmann W. Distribution of npl-1-alk and x-alk fusion transcripts in paediatric anaplastic large cell lymphoma: A molecular-histological correlation. *Br J Haematol* 2009; 146:306–309.
4. Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, Parwaresch R, Zimmermann M, Yakisan E, Dopfer R, Bucskey P, Mann G, Gadner H, Riehm H. Successful treatment strategy for ki-1 anaplastic large-cell lymphoma of childhood: A prospective analysis of 62 patients enrolled in three consecutive berlin-frankfurt-munster group studies. *J Clin Oncol* 1994; 12:899–908.
5. Seidemann K, Tiemann M, Schrappe M, Yakisan E, Simonitsch I, Janka-Schaub G, Dorff W, Zimmermann M, Mann G, Gadner H, Parwaresch R, Riehm H, Reiter A. Short-pulse b-n-hodgkin lymphoma-type chemotherapy is efficacious treatment for pediatric anaplastic large cell lymphoma: A report of the berlin-frankfurt-munster group trial nhl-bfm 90. *Blood* 2001; 97:3699–3706.
6. Williams DM, Hobson R, Imeson J, Gerrard M, McCarthy K, Pinkerton CR. Anaplastic large cell lymphoma in childhood:

Analysis of 72 patients treated on the united kingdom children's cancer study group chemotherapy regimens. *Br J Haematol* 2002; 117:812–820.

7. Brugieres L, Le Deley MC, Rosolen A, Williams D, Horibe K, Wrobel G, Mann G, Zsiros J, Uyttebroeck A, Marky I, Lamant L, Reiter A. Impact of the methotrexate administration dose on the need for intrathecal treatment in children and adolescents with anaplastic large-cell lymphoma: Results of a randomized trial of the eicnhl group. *J Clin Oncol* 2009; 27:897–903.
8. Le Deley MC, Rosolen A, Williams DM, Horibe K, Wrobel G, Attarbaschi A, Zsiros J, Uyttebroeck A, Marky IM, Lamant L, Woessmann W, Pillon M, Hobson R, Mauguen A, Reiter A, Brugieres L. Vinblastine in children and adolescents with high-risk anaplastic large-cell lymphoma: Results of the randomized alcl99-vinblastine trial. *J Clin Oncol* 2010; 28:3987–3993.
9. Laver JH, Kraveka JM, Hutchison RE, Chang M, Kepner J, Schwenn M, Tarbell N, Desai S, Weitzman S, Weinstein HJ, Murphy SB. Advanced-stage large-cell lymphoma in children and adolescents: Results of a randomized trial incorporating intermediate-dose methotrexate and high-dose cytarabine in the maintenance phase of the APO regimen: A pediatric oncology group phase iii trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:541–547.
10. Alexander S, Kraveka JM, Weitzman S, Lowe E, Smith L, Lynch JC, Chang M, Kinney MC, Perkins SL, Laver J, Gross TG, Weinstein H. Advanced stage anaplastic large cell lymphoma in children and adolescents: Results of anhl0131 a randomized phase iii trial of APO versus a modified regimen with vinblastine: A report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61:2236–2242.
11. Lowe EJ, Sposto R, Perkins SL, Gross TG, Finlay J, Zwick DA, Bromowitch M. Intensive chemotherapy for systemic anaplastic large cell lymphoma in children and adolescents: Final results of

- children's cancer group study 5941. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52:335–339.
12. Barr RD, Antillon Klusmann F, Baez F, Bonilla M, Moreno B, Navarrete M, Nieves R, Pena A, Conter V, De Alarcon P, Howard SC, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Valsecchi MG, Biondi A, Velez G, Tognoni G, Cavalli F, Masera G. Asociacion de hemato-oncologia pediatrica de centro america (ahopca): A model for sustainable development in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61:345–354.
  13. Antillon F, Baez FL, Barr R, Barrantes Zamorra JC, Carrasco LF, Moreno B, Bonilla MM, Tognoni G, Valsecch MG, Howard S, Ribeiro RC, Masera G. Amor: A proposed cooperative effort to improve outcomes of childhood cancer in central america. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45:107–110.
  14. Masera G, Baez F, Biondi A, Cavalli F, Conter V, Flores A, Fontana G, Fossati Bellani F, Lanfranco P, Malta A, Mendez G, Ocampo E, Pacheco C, Riva L, Sala A, Silva F, Sessa C, Tognoni G. North-south twinning in paediatric haemato-oncology: The la mascota programme, nicaragua. *Lancet* 1998; 352:1923–1926.
  15. Wilimas JA, Ribeiro RC. Pediatric hematology-oncology outreach for developing countries. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001; 15:775–787.
  16. Howard SC, Marinoni M, Castillo L, Bonilla M, Tognoni G, Luna-Fineman S, Antillon F, Valsecchi MG, Pui CH, Ribeiro RC, Sala A, Barr RD, Masera G. Improving outcomes for children with cancer in lowincome countries in latin america: A report on the recent meetings of the monza international school of pediatric hematology/oncology (mispho)-part i. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48:364–369.
  17. Gupta S, Antillon FA, Bonilla M, Fu L, Howard SC, Ribeiro RC, Sung L. Treatment-related mortality in children with acu-

- te lymphoblastic leukemia in central america. *Cancer* 2011; 117:4788–4795.
18. Gupta S, Bonilla M, Fuentes SL, Caniza M, Howard SC, Barr R, Greenberg ML, Ribeiro R, Sung L. Incidence and predictors of treatment-related mortality in paediatric acute leukaemia in el salvador. *Br J Cancer* 2009; 100:1026–1031.
  19. Quintana Y, Patel AN, Arreola M, Antillon FG, Ribeiro RC, Howard SC. Pond4kids: A global web-based database for pediatric hematology and oncology outcome evaluation and collaboration. *Stud Health Technol Inform* 2013; 183:251–256.
  20. Ayoub L, Fu L, Pena A, Sierra JM, Dominguez PC, Pui CH, Quintana Y, Rodriguez A, Barr RD, Ribeiro RC, Metzger ML, Wilimas JA, Howard SC. Implementation of a data management program in a pediatric cancer unit in a low income country. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 49:23–27.
  21. Pillon M, Gregucci F, Lombardi A, Santoro N, Piglione M, Sala A, D'Amore ES, De Santis R, Casale F, Zecca M, Mussolin L, Rosolen A. Results of aieop lnh-97 protocol for the treatment of anaplastic large cell lymphoma of childhood. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:828–833.
  22. Mostert S, Arora RS, Arreola M, Bagai P, Friedrich P, Gupta S, Kaur G, Koodiyedath B, Kulkarni K, Lam CG, Luna-Fineman S, Pizer B, Rivas S, Rossell N, Sitaresmi MN, Tsimicalis A, Weaver M, Ribeiro RC. Abandonment of treatment for childhood cancer: Position statement of a siop podc working group. *Lancet Oncol* 2011; 12:719–720.
  23. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:451–481.
  24. Navarrete M, Rossi E, Brivio E, Carrillo JM, Bonilla M, Vasquez R, Pena A, Fu L, Martinez R, Espinoza CM, Lacayo LF, Ro-

- driguez H, Batista R, Barr R, Howard SC, Ribeiro RC, Masera G, Biondi A, Conter V, Valsecchi MG. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in central america: A lower-middle income countries experience. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61:803–809.
25. Metzger ML, Howard SC, Fu LC, Pena A, Stefan R, Hancock ML, Zhang Z, Pui CH, Wilimas J, Ribeiro RC. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia in resource-poor countries. *Lancet* 2003; 362:706–708.
26. Paintsil V, David H, Kambugu J, Renner L, Kouya F, Eden T, Hesseling P, Molyneux E, Israels T. The collaborative wilms tumour africa project; baseline evaluation of wilms tumour treatment and outcome in eight institutes in sub-saharan africa. *Eur J Cancer* 2015; 51:84–91.
27. Orem J, Mulumba Y, Algeri S, Bellocco R, Mangen FW, Mbidde EK, Weiderpass E. Clinical characteristics, treatment and outcome of childhood burkitt's lymphoma at the uganda cancer institute. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105:717–726.
28. Widjajanto PH, Sumadiono S, Purwanto I, Sutaryo S, Veerman AJ. L-asparaginase: Long-term results of a randomized trial of the effect of additional 3 doses during consolidation treatment in the indonesian wkall- 2000 protocol. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35:597–602.
29. Yadav SP, Rastogi N, Kharya G, Misra R, Ramzan M, Katewa S, Dua V, Bhat S, Kellie SJ, Howard SC. Barriers to cure for children with cancer in india and strategies to improve outcomes:Areport by the indian pediatric hematology oncology group. *Pediatr Hematol Oncol* 2014; 31:217–224.
30. Brugieres L, Pacquement H, Le Deley MC, Leverger G, Lutz P, Paillard C, Baruchel A, Frappaz D, Nelken B, Lamant L, Patte C. Single-drug vinblastine as salvage treatment for refractory or re-



lapsed anaplastic large-cell lymphoma: A report from the french society of pediatric oncology. *J Clin Oncol* 2009; 27:5056–5061.

31. Garner R, Li Y, Gray B, Zori R, Braylan R, Wall J, Hunger SP. Long-term disease control of refractory anaplastic large cell lymphoma with vinblastine. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31:145–147.
32. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, Matous J, Ramchandren R, Fanale M, Connors JM, Yang Y, Sievers EL, Kennedy DA, Shustov A. Brentuximab vedotin (sgn-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: Results of a phase ii study. *J Clin Oncol* 2012; 30:2190–2196.
33. Gambacorti-Passerini C, Messa C, Pogliani EM. Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2011; 364:775–776.
34. Mosse YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, Rolland D, Balis FM, Maris JM, Weigel BJ, Ingle AM, Ahern C, Adamson PC, Blaney SM. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: A children's oncology group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol* 2013; 14:472–480.
35. Hesseling P, Israels T, Harif M, Chantada G, Molyneux E. Practical recommendations for the management of children with endemic burkitt lymphoma (bl) in a resource limited setting. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60:357–362.
36. Israels T, Renner L, Hendricks M, Hesseling P, Howard S, Molyneux E. Siop podc: Recommendations for supportive care of children with cancer in a low-income setting. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60:899–904.
37. Israels T, Moreira C, Scanlan T, Molyneux L, Kampondeni S, Hesseling P, Heij H, Borgstein E, Vujanic G, Pritchard-Jones K,

- Hadley L. Siop podc: Clinical guidelines for the management of children with wilms tumour in a low income setting. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60:5–11.
38. Chantada G, Luna-Fineman S, Sitorus RS, Kruger M, Israels T, Leal-Leal C, Bakhshi S, Qaddoumi I, Abramson DH, Doz F. Siop-podc recommendations for graduated-intensity treatment of retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60:719–727.
39. Parkes J, Hendricks M, Ssenyonga P, Mugamba J, Molyneux E, Schouten-van Meeteren A, Qaddoumi I, Fieggen G, Luna-Fineman S, Howard S, Mitra D, Bouffet E, Davidson A, Bailey S. Siop podc adapted treatment recommendations for standard-risk medulloblastoma in low and middle income settings. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62:553–564.

# Interventions Targeting Absences Increase Adherence and Reduce Abandonment of Childhood Cancer Treatment in El Salvador

Carmen Salaverria, MSc<sup>1\*</sup>; Nuria Rossell, MSc<sup>1,2</sup>; Angelica Hernandez, RN<sup>1</sup>; Soad Fuentes Alabi, MD<sup>1</sup>; Roberto Vasquez, MD<sup>1</sup>; Miguel Bonilla, MD<sup>3</sup>; Catherine G. Lam, MD<sup>3,4,5</sup>; and Raul C. Ribeiro, MD<sup>4,5</sup>.

<sup>1</sup>Department of Oncology, Benjamin Bloom Hospital, San Salvador, El Salvador; <sup>2</sup>Amsterdam Institute for Social Sciences Research (AISSR), Amsterdam University, the Netherlands; <sup>3</sup>International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; <sup>4</sup>Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; <sup>5</sup>University of Tennessee, College of Medicine, Memphis, Tennessee.

©2015 Wiley Periodicals, Inc. DOI 10.1002/pbc.25557. Published online 29 April 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

**Correspondence to:** Carmen Salaverria, Centro Médico Ayúdame a Vivir, contiguo al anexo del Hospital Benjamin Bloom, San Salvador, El Salvador. E-mail: cesalaverria@gmail.com

## Abstract

**Background.** In El Salvador, about 200 new cases of pediatric cancer are diagnosed each year, and survival rates approach 70%. Although treatment is available at no cost, abandonment of therapy has remained at a steady yearly rate of 13% during the past decade. A time sensitive adherence tracking procedure (TS-ATP) was recently implemented to detect missed appointments, identify their causes, and intervene promptly. Procedure The study team was informed daily of patient/family failure to attend medical appointments in the pediatric oncology unit; the families were contacted and interviewed to ascertain and address the reasons. Patients who did not return after this initial contact were contacted again through local health clinics and municipalities. Law enforcement was a last resort for patients undergoing frontline treatment with a good prognosis. The system was adapted

to clinical urgency: families of patients undergoing induction therapy were contacted within 24 hr, those in other therapy phases, within 48 hr, and those who had completed treatment, within one week. Reasons for absence were obtained by telephone or in person.

**Results.** The annual rate of abandonment was reduced from 13–3% during the 2 years period. There were 1,111 absences reported and 1,472 contacts with caregivers and institutions. The three main reasons for absences were financial needs (165, 23%), unforeseen barriers (116, 16%), and domestic needs (86, 12%).

**Conclusions.** Use of the treatment adherence tracking system to locate and communicate with patients/families after missed appointments and the allocated aid stemming from these interviews substantially reduced abandonment and non-adherence.

**Key words:** adherence; childhood cancer; developing countries; patient tracking; treatment abandonment.

## Background

Abandonment of therapy, defined as either missing at least 4 consecutive weeks of scheduled treatment or not starting therapy after a cancer diagnosis,[1] is a major cause of pediatric cancer mortality in low- and mid-income countries.[2–5] Although less clearly documented, more general non-adherence to treatment (such as intermittently missing medication doses or appointments) can also reduce the effectiveness of therapy [6] and may predict a greater risk of abandoning treatment. The World Health Organization defines adherence as “the extent to which a person’s behavior... corresponds with agreed recommendations from a health care provider.”[7] Parents or caregivers are generally responsible for adherence to their child’s therapy appointments and therefore can provide insight into the causes of non-adherence and abandonment of therapy.

Low adherence to medication, such as missing chemotherapy appointments, has been observed in young patients with cancer; [8,9] they may experience lower cure rates as a consequence,[8–10] including the relapse of highly curable malignancies. The impact of poor therapy adherence on survival has not been reported in children with cancer, but it may partially explain their relatively low survival rates in low- and mid-income countries.

Medications, diagnostic procedures, and treatment for childhood cancer are provided free of charge at El Salvador's national pediatric hospital in San Salvador, and psychosocial and financial support, food and shelter are available to families. Although these measures have substantially reduced abandonment, it has remained at approximately 13% over the past decade and is still an important cause of treatment failure.[11] Therefore, additional factors in the abandonment of treatment remain to be identified.

Focusing adherence to treatment appointments, we reasoned that a first missed appointment could be interpreted as a “cry for help” and could provide important information about the unaddressed barriers to treatment. The systematic documentation of missed therapy appointments recently became possible in our unit, when an electronic tracking system was implemented for follow-up of all patient care, including admission, clinic visits, clinical examination, and chemotherapy prescription, preparation, and administration. This system also allowed the prompt detection of failure to appear for scheduled clinical visits. When a patient was considered a “no show,” the psychosocial team made family contact, obtained the reasons for the absence, and discussed possible options of help. In a similar initiative to the one we are reporting here, Kumar et al.[12] showed that interventions are more effective in a preventive frame instead of after an event of abandonment, which supports our methodology departing point of delivering tailored counseling and solutions once the first signs of discontinuity were detected. Here we describe the implementation and results of the time-sensitive adherence tracking procedure (TSATP) over a period of 2 years. The procedure was prospectively designed to allow [1] systematic detection and recording of absen-

ces,[2] contact with the patient's caregivers,[3] documentation of reasons for the absence,[4] instruction of parents about the importance of adherence, and [5] appropriate interventions to overcome barriers to a prompt return and prevent further absences.

## **Patients and methods**

### **Patients and Setting**

El Salvador has approximately six million inhabitants, of which 29% are children less than 14 years of age.[13] About 200 newcases of childhood cancer are diagnosed each year at the oncology unit within the national children's hospital (Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom), in San Salvador. This is the only referral center for childhood cancer treatment in the country. According to hospital data, approximately 70% of patients' families live in extreme poverty, having no fixed income; they survive on informal, temporary work and have a monthly income below \$50. Sixteen percent live in poverty (monthly income<\$250), and only 14% live above the poverty level. Despite high poverty levels among the population, all Salvadorans own a cellular phone or have a family member who owns one, which allowed the tracking procedure to function. All children with cancer under age 12 years are treated in the pediatric oncology unit. All patients in active treatment must visit the hospital at least once weekly, although about half reside in rural areas.

An undetermined number of patients' missed appointments were undetected until the TS-ATP was implemented to reduce absences by early detection, investigation of the reasons for absence, and provision of appropriate economic, emotional, and educational support. Our analysis included all newly diagnosed patients as well as those undergoing treatment prior to the implementation of the TS-ATP, who missed one or more appointments between January 2011 and December 2012, for solid or hematological malignancies, who were on or off treatment, receiving palliative care, or undergoing diagnostic confirmation.

## Procedure

### *Adherence tracking.*

Was conducted by a psychosocial team comprising two psychologists, a social worker, and a nurse educator. Absences were detected by two routes. For clinical appointments, the charts of absent patients were collected; for chemotherapy appointments, the electronic system showed which scheduled patients' chemotherapy had not been prepared in pharmacy, identifying a no show. The team initiated an entry in a database created for this purpose at the time a patient failed to appear for a scheduled appointment. Patients' names were highlighted in the database to indicate that contact with the family was pending. The TS-ATP procedure is shown in Figure 1.

### *Patient/family contact and interviews.*

The intervention process began with attempted telephone or personal contact with the child's caregiver to ascertain the reasons for the absence (by open-ended questions), emphasize the importance of therapy adherence, and discuss options that might quickly return the child to the hospital. The call/interview and its contents were reported in the database. Patients with ALL in the induction phase were contacted within 24 hr, all other patients in treatment within 48 hr, and patients off treatment within a week. We intentionally focused the tone of the calls and interviews more on concern and willingness to help than on reprimanding the caregivers. After the patient arrived at the hospital, the entry highlight was removed but information about the absence, and the intervention process remained in the database. If no reasons were given for the absence or if a more in-depth interview was needed, for example for families experiencing greater difficulty, a member of the psychosocial team interviewed the caregivers after their return to the hospital.

Importantly, we categorized the act of contacting the parent/caregiver in itself as an intervention, reflecting the profound effect that personal attention from a clinical professional can have on the average parent in this setting. Most patients' families live in deep poverty and lack even basic education, creating a great economic and

sociocultural divide between these families and the educated professionals who care for them. The effort of a clinician to reach out in a caring manner can deeply impress and motivate a child's caregivers. The information obtained from the interviews and the discussion of options was promptly entered into the database and was available to all team members.

These reasons for absences were later assigned categories. Specific interventions were devised according to the reasons stated for the absences. If a patient failed to appear at the hospital for several days after initial retrieval attempts, the health unit (within the national health care system) nearest to the patient's residence was contacted, and local nurses or health workers visited the caregivers' home to check on patients and persuade the parents to take the child to the hospital. If this effort proved unsuccessful for a patient undergoing frontline treatment with curative intent, the case was referred to social services to be pursued according to a law introduced in 2010 to protect the welfare of children. This law states that when a child requires treatment for a life-threatening condition, the medical instructions must be followed. The hospital's social services report the child's case to the pertinent state authorities and locate the patient to return him to the hospital. When the child was not located before the 4 week hiatus from treatment, the case was entered in the database as abandonment. The disruptive nature of this procedure for the family unit is the reason why the hospitals team resorts to this measure as a last option. For missed appointments of patients off treatment with no contact information, their last attendance was verified in an online internal database of the hospital.

Information entered into the database included patient identification, treatment phase, contact information, date and type of absence, date and type of attempt made to contact the parents, time required for each attempt or contact, reasons given for the absence, team member who made the contact, travel distance to the hospital, and monthly family income which was available from the initial diagnosis interview of all patients. All members of the team updated the database daily. The psychologists categorized the stated reasons

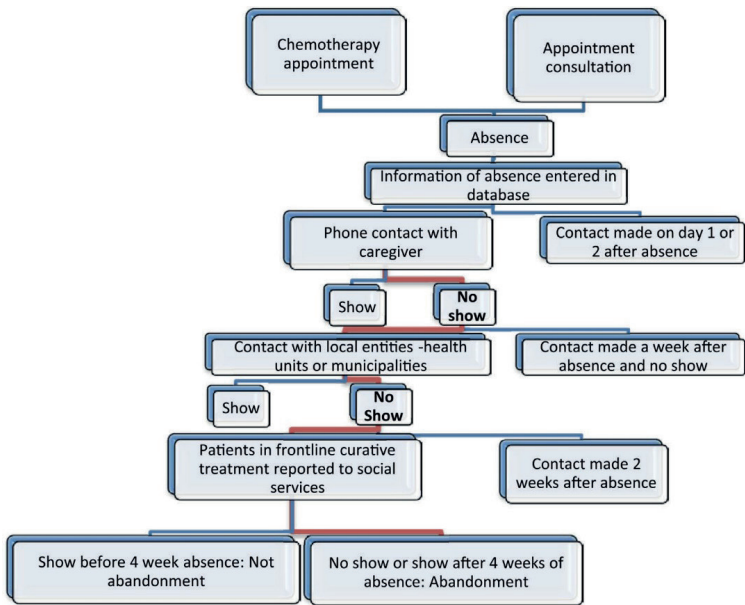


for absence on the basis of information from the interviews, together with parents' past interviews and psychosocial records.

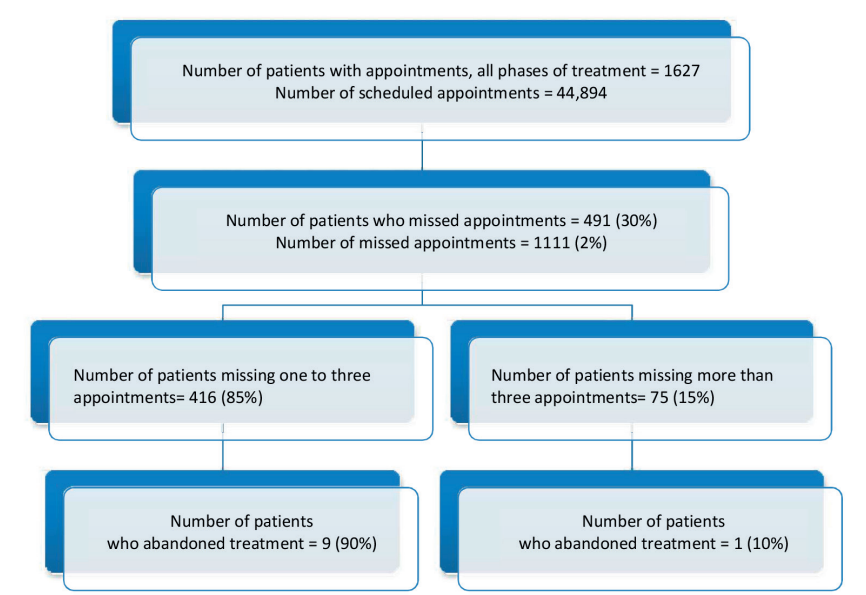
**Specific interventions.**

Specific interventions were devised to address the reasons given for absence and could include financial aid, food, and/or shelter (if not previously offered), counseling for emotional hardship, and instruction to improve understanding of or adjustment to the treatment regimen or hospital routine. Although assistance might have been available earlier for these families, their level of need might not have been fully appreciated. The assessment of the patient's needs and provision of any type of aid was based on the criteria of the social worker and the psychologists. The social worker has ample knowledge of the cost of travel expenses from all over the country and allocated financial aid to those with a greater financial burden in terms of travel expenses.

**Figure 1.** Procedure of TS ATP. Red lines show the trajectory of the patients who eventually abandoned treatment and the interventions done by the team to stop this.



**Figure 2.** Flow chart of appointments made and missed in the pediatric oncology unit during the 2 years study period, showing the rate of abandonment of therapy in patients who missed 1–3 visits (0.022) and in those who missed more than three visits (0.013). Two patients who refused treatment and had no absences are excluded from flow chart



## Results

### Patients and Missed Appointments

During the 2 year period, 25,953 physician appointments and 18,941 ambulatory chemotherapy appointments were scheduled (Figure 2). Of these, 1,313 appointments were missed by patients in any phase of treatment; 202 (15%) were erroneously reported as absences due to scheduling changes not registered in the electronic system or patients' arrival after the day's attendance had been documented. The remaining 1,111 absences reflected appointments for 491 patients, some of whom had numerous absences sometimes at

different phases of treatment. There were 1–18 absences per patient. Most patients (416/491, 85%) had one to three absences, accounting for 53% (588/1,111) of absences. The remaining 75/491 (15%) patients had 4–18 absences. Missed appointments increased during the rainy season (May through October). During year 1, 23% of all absences were counted in October, when a tropical storm paralyzed public transportation for 2 weeks. Absences were relatively uniform during the dry season. Phase of treatment at the time of absence is shown in Table I.

### **Contact with caregivers**

Of the 1,111 absences, 806 (73%) had successful contacts. Contact with patients who had missed appointments or verify their return to the hospital after an absence resulted in 1,472 attempts. Some patients had several attempts to contact. Of these 1,472 attempts, 1,379 (94%) resulted in interviews. Most were conducted by telephone (1,005; 68%) and the rest in person (374; 25%). The remaining 93 (6%) were patients off treatment and a treatment protocol database was used to search for their last attended appointment in case they had shown up and it was not detected. (Table I).

No contact with the parent/caregiver was made for 305 (27%) absences. Of these, 183 (60%) were absences of patients off treatment whose contact information was outdated. The remaining 122 absences (40%) were of patients in treatment, palliative care, or pending diagnosis. This category included patients who had already returned to the hospital prior to a contact attempt or with whom attempted contact was unsuccessful (e.g., unanswered calls, disconnected telephones).

### **Patients in active treatment**

The 269 patients in active treatment had 704 absences. Of these, 486 absences (69%) were of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL), 34 (5%) were of children with CNS neoplasms, 62 (9%) were of children with lymphomas, and the remaining 137

(19%) corresponded to other neoplasms. Of these 269 patients, 128 (48%) had one absence, 59 (22%) had two absences, and 29 (11%) had three absences. The remaining 53 (19%) patients had 4 to 18 absences.

The 704 absences during active treatment prompted 1,098 attempts at contact, representing 75% of the 1,472 total attempted contacts: 790 (72%) telephone calls, 301 (27%) interviews, and 7 (1%) searches for last attended appointment. Seven patients undergoing frontline treatment with curative intent had caregivers who declined to return to the hospital; meetings of the pediatric oncology interdisciplinary team resulted in a decision to report these cases to social services for legal action. Four of the seven children were returned for treatment within 4 weeks. The remaining three were returned later and were classified as having abandoned treatment. Table I shows absence rates and contact interventions during all phases of treatment and during active treatment.

## **Abandonment of Treatment**

During these 2 years of adherence tracking, the annual rate of abandonment was reduced to 3%. Twelve of the 269 patients on active therapy did not return to the hospital within 4 weeks despite telephone contact and were classified as having abandoned treatment. Two patients' caregivers refused curative treatment outright; seven patients abandoned treatment with no prior absences, while three patients had had two, three, and six absences, respectively, before abandoning treatment. Of these 12 patients, 7 (59%) were male. Five of the 12 patients required amputation or other complex surgery, and parents attributed their refusal or abandonment of therapy in part on their fear of or disagreement with the child's surgery. Attempts were made to contact and bring back all children as quickly as feasible after their absence was detected, except in three cases: one child with retinoblastoma whose caregiver refused enucleation outright, one child who had an undetected absence of one month before returning, and a patient with ALL who had a complex constitutional medical condition and whose caregiver refused curative

treatment for ALL. Ten of the 12 cases of abandonment occurred within 6 months of beginning therapy, and six occurred during the first two months. The cases of patients who abandoned therapy are characterized in Table II.

Reasons Given for Absence

Table III categorizes the reasons given by caregivers for the patient's absence. Lack of funds was most common (165; 23%).The Domestic Needs category (86; 12%) included illness of the primary caregiver (53%) or another family member (22%) and the primary caregiver's conflicting responsibility for the care of other family members. Fourteen of these caregivers (12%) stated that no one else was available to take the child to the hospital. The Unforeseen Events category (116; 16%) included weather conditions (71 absences, 61%) and transportation problems (28 absences, 24%). Finances, domestic needs, and unforeseen events accounted for 52% of patient absences.

Table I. Absences and Interventions According to Phase of Treatment

All Phases of Treatment, n (%)			In Treatment, n (%)	
Number of Absences	1,111		704	
	In treatment	704 (63)		
	Off treatment	326 (29)		
	Palliative Care	61 (6)		
Absences with No Intervention*	Pending Diagnosis 305 (27)	20 (2)	108 (15)	
Total Number of Interventions	1,472		1,098	
	Telephone Calls	1,005 (68)	Telephone Calls	790 (72)
	Interviews	374 (26)	Interviews	301 (27)
	Database Searches	93 (6)	Database Searches	7 (1)

\*Refers to either no attempt to contact or no answer obtained from attempted contact.

Table II. Characteristics of the 12 Cases of Abandonment of Treatment

Case	Diagnosis	Age at Diagnosis (years)	Sex	Time since Diagnosis at Time of Abandonment (years)	Number of Previous Absences	Legal Intervention
1	ALL	2.5	Female	0	Refusedb	No
2	Retinoblastoma	2.2	Male	.36	0	No
3	Ewing Sarcoma	3.4	Female	.6	0	No
4	CNS Tumor	2.7	Male	1.3	Refusedb	No
5	Ewing Sarcoma	11.3	Male	1.8	0	No
6	ALL	3.0	Female	2.3	0	Yes
7	Sarcoma	12.2	Male	3	0	No
8	Wilms Tumor	4.1	Male	4.3	0	No
9	Wilms Tumor	2.1	Female	5.2	0	No
10	Hodgkin Lymphoma	6.8	Male	6.4	6	No
11	Histiocytosis	4.2	Female	7.9	3	Yes
12	ALL	6.8	Male	12.3	2	Yes

ALL, acute lymphoblastic leukemia; CNS Central Nervous System <sup>a</sup>Abandonment was defined as failure to start or complete medically indicated curative therapy. <sup>b</sup>Patients listed as “refused” attended treatment appointments but never began curative therapy . Therefore, they abandoned therapy despite not missing appointments.

Table III Post-Hoc Categorization of Caregivers’ Reported Reasons for Absence

Category	Description	Number of Absences (%)
Financial Need	Lacked funds for travel on day of appointment Financial/ transportation aid was not available on day of appointment	165 (23)
Unforeseen Barriers	Natural Disaster (rain, flood, etc.) Public transportation problem (labor strike, not in service, etc.)	116 (16)
Domestic Needs	Caregiver was ill; no one else could bring child to hospital Caregiver must care for another ill family member and one else could bring child to hospital Avoid income loss (e.g., no permission from employer, a job opportunity for the day)	86 (12)
Caregiver Decided Against Treatment	Non-compliant treatment Attending other appointments (school, community meetings, others) Importantly, parents had a choice and opted to miss the appointment	69 (10)
Caregiver Error	Caregiver confused or forgot appointment date	56 (8)

Ongoing Demands	Constantly demanding living conditions (stresses of family conflicts, lack of funds, other family members' emotional/ physical health)	48 (7)
Missing Information	Contact/intervention was done but reason for absence not obtained or not documented	34 (5)
Caregiver Disagreed with Treatment	Caregiver fearful of emotional and physical consequences of treatment (side effects, surgery, radiotherapy) Alternative treatment opted	16 (2)
Miscellaneous	Unclassifiable	6 (1)
Palliative Care	Patients not in curative treatment; appointments could be attended when comfortable for the child	

## Discussion

We have described the first two years of application of the TS ATP, an intervention to address patients' missed appointments. The absences were detected during the scheduled appointment day and the parent/caregiver was contacted within the following 24–48 hr. Prompt contact and the process of interviews and actions allowed us to obtain most parents' reasons for absence and to provide appropriate aid to prevent or reduce further absences. The main reported barrier to keeping appointments was lack of funds, either sporadic or continuous; the distribution of family tasks and support also played a role. To address these problems, financial assistance was given or increased, and options for temporary housing were coordinated. The annual abandonment rate fell from 13% to 3% during the two years of this intervention.

Understanding the causes of missed therapy appointments is crucial for proper resource allocation to reduce or prevent abandonment. Our procedure was highly effective in the prompt detection and follow-up of missed appointments. Our success in improving treatment adherence was attributable to the daily commitment of the monitoring team to contact parents and to ascertain and address their specific needs, which in many cases enhanced the parent–care team relationship. The availability of a computer-based system that facilitated prompt detection was the starting point of this intervention, allowing information to be accessed and updated at any time

by any member of the group; however, the effort and commitment of the team in locating the patient/family, obtaining the information, and following a procedure to reduce or prevent absences was the decisive factor for success.

Despite free treatment and hospitalization and subsidies for housing, food, and transportation, financial need remained a significant cause of missing appointments. In some cases, patients who had missed several appointments were retained in therapy by provision of financial aid and psychosocial support. Contact by the care team was highly meaningful to parents in itself and increased their willingness to continue treatment despite great adversity. However, the parents' explanations showed that more complex issues, mainly lack of help in meeting family demands, also affected their ability to appear for appointments.

We found no clear relation of the number of missed appointments to the likelihood of abandonment. The fact that some patients who abandoned treatment had missed no previous appointments, or missed only a few, suggests that immediate attention should be given to each absence, even if only one appointment is missed.

Parents' need for additional financial aid to comply with treatment raises several questions. It is possible that parents who have multiple absences despite financial support for transportation may have become dependent on these funds to comply with treatment responsibilities. These parents expressed the lack of availability of this financial aid on the expected date as an impediment to comply adherently to treatment. This increases the need for the institution to secure these means to be always available. Future research should examine where the parents perceive their responsibility to lie after an institution begins to facilitate or underwrite travel. Although it was not systematically documented, some interviews with parents suggested that during the often lengthy process of treatment, parents began to consider it the hospital's responsibility to provide the necessary means for the child to receive treatment as planned and became less concerned about adherence to treatment.



Ten percent of missed appointments were attributed to lack of a second adult to take over domestic needs, even during a patient's medical emergencies. A significant number of families live at the limits of their capacity to manage domestic and job demands and cannot accommodate unexpected burdens. Similarly, interviews and focus groups with parents of children undergoing cancer treatment in Malawi showed that immediate family members would help with tasks at home to facilitate a parent's travel to the hospital, but community commitment was not strong. [14] Further studies should explore to what extent this type of family isolation is inescapable and to what extent it could be remedied by seeking alternative options for assistance.

All but one case of abandonment occurred during the first year of treatment, with the highest incidence during the first months, as reported in other studies, [11,15,16] confirming that surveillance of treatment adherence and prompt guidance of parents is vital during this time. We demonstrated that such monitoring and immediate intervention reduces abandonment. Similarly, Brown et al. found in Saudi Arabia that close monitoring increased treatment adherence in a comparable group of patients.[17] Moreover, a report from Recife, Brazil described how immediate tracking of patients' absences, together with psychosocial support integrated in the medical care, can substantially reduce abandonment.[18] As in Recife, El Salvador's pediatric cancer program provides several types of psychosocial intervention, and addition of the treatment adherence tracking program appears to be reducing abandonment to an extent similar to that in Brazil.

Team members perceived that most caregivers and family members were surprised and impressed by the professionals' attention and appreciative of their concern after a missed appointment; we intend to further analyze the implications of this effect. However, we believe that the involvement and support of local groups in helping to locate patients also helped to persuade the parents to continue their child's treatment. It is possible that the parents realize that others care and are aware of their decisions regarding their child's health.

Despite the many effective interventions that quickly located and retrieved absent patients, there remained at the time of this report room for improvement in updating patients' contact information and inability to respond to an absence on the same day it occurred. Additionally, time could be saved by improving clerical procedures and clinician communication to prevent erroneous absence notifications. Other difficulties included the unavailability of a team member to perform interviews at all times, subjective differences in implementation of the routine, and the accuracy of the registered information. Although tracking of missed appointments and subsequent intervention were time consuming, such a project is feasible and worthwhile.

Immediate detection and remediation of absences was successful in securing patients' prompt return to the hospital, reducing the decade-long 13% rate of abandonment to 3% in both study years. Interviews and supportive contact with caregivers allowed us to identify their immediate needs and intervene as warranted to reduce absences. Interventions typically involved financial assistance, emotional support, and instruction about the importance of treatment adherence. Rarely, law enforcement measures were necessary.

### **Acknowledgments**

We thank Sharon Naron for expert scientific review. This work was supported in part by Cancer Center Support (CORE) grant P30CA021765-30 from the National Institutes of Health, by a Center of Excellence Grant from the State of Tennessee, and by the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC).

### **References**

1. Mostert S, Arora RS, Arreola M, Bagai P, Friedrich P, Gupta S, Kaur G, Koodiyedath B, Kulkarni K, Lam CG, Luna-Fineman S, Pizer B, Rivas S, Rossell N, Sitaresmi MN, Tsimicalis A, Weaver M, Ribeiro RC. Abandonment of treatment for childhood

cancer: position statement of a SIOP PODC Working Group. *Lancet Oncol* 2011; 12:719–720.

2. Spinetta J, Masera G, Eden T, Oppenheim D, Martins A, van Dongen Melman J, Siegleret M, Eiser C, Weyl Ben Arush M, Kosmidis HV, Jankovic M. Refusal, noncompliance, and abandonment of treatment in children and adolescents with cancer. A report of the SIOP Working Committee on Psychosocial Issues in Pediatric Oncology. *Med Pediatric Oncol* 2002; 38:114–117.
3. Lam C, Rossell N, Ribeiro R. Global snapshots of treatment abandonment in children and adolescents with cancer: Social factors, implications and priorities. *J Healthcare Sci Hum* 2012; 2:81–110.
4. Arora RS, Pizer B, Eden T. Understanding refusal and abandonment in the treatment of childhood cancer. *Indian Pediatrics* 2010; 47:1005–1010.
5. Mostert S, Gunawan S, Wolters E, van de Ven P, Sitaresmi M, van Dongen J, Veerman A, Mantik M, Kaspers G. Socio-economic status plays important role in childhood cancer treatment outcome in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:6491–6496.
6. Butow P, Palmer S, Pai A, Goodenough B, Lockett T, King M. Review of adherence-related issues in adolescents and young adults with cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:4800–4809.
7. World Health Organization. Adherence to long-term therapies: Evidence for action. Sabate E, editor. Switzerland: World Health Organization; 2003. p. 194.
8. Coccia PF, Altman J, Bhatia S, Borinstein SC, Flynn J, George S, Goldsby R, Hayashi R, Huang MS, Johnson RH, Beupin LK, Link MP, Oeffinger KC, Orr KM, Pappo AS, Reed D, Spraker

- HL, Thomas DA, von Mehren M, Wechsler DS, Whelan KF, Zebrack B, Sundar H, Shead DA. Adolescent and young adult oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2012; 10:1112–1150.
9. Kondryn HJ, Edmondson CL, Hill J, Eden TO. Treatment non-adherence in teenage and young adult patients with cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:100–108.
  10. Castellano JM, Copeland-Halperin R, Fuster V. Aiming at strategies for a complex problem of medical nonadherence. *Glob Heart* 2013; 8:263–271.
  11. Bonilla M, Rossell N, Salaverria C, Gupta S, Barr R, Sala A, Metzger ML, Sung L. Prevalence and predictors of abandonment of therapy among children with cancer in El Salvador. *Int J Cancer* 2009; 125:2144–2146.
  12. Kumar A, Moulik NR, Mishra RK, Kumar D, Causes. Outcome and prevention of abandonment in retinoblastoma in India. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60:771–775.
  13. Central Intelligence Agency. The world factbook. [Cited 2013 19 October]; Available from: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/es.html>.
  14. Israe'ls T, Chirambo C, Caron H, de Kraker J, Molyneux E, Reis R. The guardians' perspective on paediatric cancer treatment in Malawi and factors affecting adherence. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51:639–642.
  15. Metzger M, Howard S, Fu L, Peña A, Stefan R, Hancock M, Zhang Z, Pui CH, Wilimas J, Ribeiro RC. Outcome of childhood acutelymphoblastic leukaemia in resource-poor countries. *Lancet* 2003; 362:706–708.
  16. Li E, Jin R. Causes for refusal or abandonment during treat-

- ment of pediatric acute promyelocytic leukemia. *LeukRes* 2012; 36:E193.
17. Brown S, Belgaumi A, Kofide A, Littlechild B, Sabbah R, Ezzat A, Shoukri M, Barr R.
  18. Levin A. Failure to attend appointments and loss to follow-up: A prospective study of patients with malignant lymphoma in Riyadh, Saudi Arabia. *Eur J Cancer Care* 2009; 18:313–317.
  19. Howard SC, Pedrosa M, Lins M, Pedrosa A, Pui C-H, Ribeiro RC, Pedrosa F. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. *JAMA* 2004; 291:2471–2475.

## Low Socioeconomic Status Is Associated with Prolonged Times to Assessment and Treatment, Sepsis and Infectious Death in Pediatric Fever in El Salvador

**Citation:** Gavidia R, Fuentes SL, Vasquez R, Bonilla M, Ethier M-C, et al. (2012) Low Socioeconomic Status Is Associated with Prolonged Times to Assessment and Treatment, Sepsis and Infectious Death in Pediatric Fever in El Salvador. PLoS ONE 7(8): e43639. Doi:10.1371/journal.pone.0043639. **Editor:** Kara K. Wools-Kaloustian, Indiana University, United States of America **Received:** April 12, 2012; **Accepted:** July 23, 2012; **Published:** August 22, 2012 **Copyright:** ©2012 Gavidia et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. **Funding:** Dr. Sung is supported by a New Investigator Award from the Canadian Institutes of Health Research (Grant No. 87719). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. **Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Ronald Gavidia<sup>1</sup>, Soad L. Fuentes<sup>1</sup>, Roberto Vasquez<sup>1</sup>, Miguel Bonilla<sup>1</sup>

Marie-Chantal Ethier<sup>2</sup>, Caroline Diorio<sup>2</sup>, Miguela Caniza<sup>4, 6</sup>, Scott C. Howard<sup>5, 6</sup>, Lillian Sung<sup>2, 3 \* \*</sup>

\*E-mail: lillian.sung@sickkids.ca

<sup>1</sup>Pediatric Oncology, Benjamin Bloom National Children's Hospital, San Salvador, El Salvador; <sup>2</sup>Child Health Evaluative Sciences. The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada; <sup>3</sup>Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada. <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, United States of America. International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, United States of America; <sup>5</sup>Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, United States of America; <sup>6</sup>International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, United States of America.

## Abstract

**Background.** Infection remains the most common cause of death from toxicity in children with cancer in low- and middle-income countries. Rapid administration of antibiotics when fever develops can prevent progression to sepsis and shock, and serves as an important indicator of the quality of care in children with acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia. We analyzed factors associated with (1) Longer times from fever onset to hospital presentation/antibiotic treatment and (2) Sepsis and infection-related mortality.

**Method.** This prospective cohort study included children aged 0–16 years with newly diagnosed acute leukemia treated at Benjamin Bloom Hospital, San Salvador. We interviewed parents/caregivers within one month of diagnosis and at the onset of each new febrile episode. Times from initial fever to first antibiotic administration and occurrence of sepsis and infection related mortality were documented.

**Findings.** Of 251 children enrolled, 215 had acute lymphoblastic leukemia (85.7%). Among 269 outpatient febrile episodes, median times from fever to deciding to seek medical care was 10.0 hours (interquartile range [IQR] 5.0–20.0), and from decision to seek care to first hospital visit was 1.8 hours (IQR 1.0–3.0). Forty-seven (17.5%) patients developed sepsis and 7 (2.6%) died of infection. Maternal illiteracy was associated with longer time from fever to decision to seek care ( $P = 0.029$ ) and sepsis (odds ratio [OR] 3.06, 95% confidence interval [CI] 1.09–8.63;  $P = 0.034$ ). More infectious deaths occurred in those with longer travel time to hospital (OR 1.36, 95% CI 1.03–1.81;  $P = 0.031$ ) and in families with an annual household income, US\$2,000 (OR 13.90, 95% CI 1.62–119.10;  $P = 0.016$ ).

**Interpretation.** Illiteracy, poverty, and longer travel times are associated with delays in assessment and treatment of fever and with sepsis and infectious mortality in pediatric leukemia. Providing additional education to high-risk families and staying at a nearby guest house during periods of neutropenia may decrease sepsis and infectious mortality.

## Background

There has been steady improvement in treatment outcomes for children with acute leukemia over the past few decades. Unfortunately, these advances in survival have not fully translated into low- and middle-income countries (LMIC) where event-free survival is significantly lower than in high-income countries [1] because of higher rates of relapse, abandonment of treatment, and treatment-related mortality (TRM).

In El Salvador, TRM is responsible for about 50% of deaths in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML), [2] with a two-year cumulative incidence of TRM of 12.561.7% for ALL and 35.166.4% for AML (P, 0.0001). Infections were the most common cause of TRM, and 12.3% of episodes of febrile neutropenia resulted in death. [3] Among children with ALL (but not AML), low monthly income and low parental education were associated with significantly higher TRM. [2] Given that ALL is primarily managed in the outpatient setting and that AML is primarily managed in the inpatient setting, we hypothesized that delays in seeking care for febrile neutropenia may be the link between socioeconomic status and TRM in ALL and might explain the absence of a connection in children with AML, who remain in or near the hospital during their entire course of treatment.

In this study, we prospectively evaluated the association between socioeconomic status and times to assessment and treatment for fever, and with rates of sepsis and infectious mortality.

## Methods

### Participants and Setting

We included children younger than 17 years with ALL and AML newly diagnosed from May 1, 2008 to March 21, 2011 and treated at Benjamin Bloom National Children's Hospital (Hospital Bloom) in



San Salvador, El Salvador. Hospital Bloom has had a long standing partnership with St. Jude Children's Research Hospital. We excluded those with an initial palliative intent of treatment. Hospital Bloom is the only hospital in El Salvador that admits and treats children with cancer, and cares for approximately 200 newly diagnosed children with cancer each year. Treatment was provided at no cost to families; accommodation and child care were also offered free to families living significant distances from the hospital to reduce abandonment of therapy. This study was approved by the Institutional Review Boards at Hospital Bloom and The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada and informed written consent was obtained from parents, children ages 12 to 18 and healthcare professionals.

## **Procedure**

We interviewed parents/caregivers within one month of diagnosis to establish baseline demographic and treatment variables, and to determine knowledge related to causes of fever, likelihood of having difficulty bringing their child to hospital in the event of fever, and perceived barriers to bringing their child to hospital. Literacy was measured by asking parents to describe their highest level of education completion: (a) Advanced/university/ professional school; (b) High school; (c) Secondary/middle school;

(d) Primary/elementary school; or (e) Illiterate. Those who self-classified themselves as illiterate were compared to those who had had completed at least primary or elementary school. In order to determine knowledge related to causes of fever, the following categories were provided and the respondent could choose all that applied: (a) Being around sick people; (b) Weather conditions; (c) Food; (d) Receiving chemotherapy; and (e) Low blood counts. Respondents were also allowed to select "other" and to provide further description.

Interviews were repeated at the onset of each new febrile episode irrespective of whether the child was an inpatient or an outpatient. Fever was defined as an oral temperature  $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$  or  $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$  twice within twelve hours. At these interviews, times from initial

fever to decision to seek medical care, presentation to the hospital, obtaining a complete blood count, and initial administration of intravenous broad-spectrum antibiotic therapy were obtained for outpatients, and time from initial fever to administration of antibiotic therapy was obtained for inpatients. The ability to monitor temperature at home and use of oral antibiotic therapy at home prior to travel to the hospital were also collected. Potential causes of delay at each of these steps were solicited using open-ended questions. All interviews were conducted orally in Spanish by a single investigator who worked as a physician at Hospital Bloom (RG). Only the first febrile episode during a single hospital admission was captured but a child could have multiple febrile episodes over the course of treatment.

Patients were monitored for febrile episodes from diagnosis until the patient recovered from their last cycle of chemotherapy, died in remission, relapsed, abandoned therapy, or experienced a second malignancy (whichever occurred first).

**Table 1.** *Demographics of Enrolled Children with Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia and Acute Myeloid Leukemia (N = 251)*

Characteristic	Value
Child Characteristics	
Male (%)	133 (53.0)
Median age in years (IQR)	5.2 (2.8, 9.2)
Median BMI percentile (IQR) <sup>a</sup> (n = 218)	44.9 (6.2, 84.7)
ALL (%)	215 (85.7)
AML (%)	36 (14.3)
Parent Characteristics	
Primary caregiver	
Both mother and father <sup>b</sup>	169 (67.3)
Mother only	61 (24.3)
Father only	6 (2.4)
Mother works (%)	63 (25.1)
Father works (%)	172 (68.5)
Primary caregiver mother education <sup>b</sup> (n = 230)	
Advanced (%)	32 (13.9)

High school (%)	39 (17.0)
Secondary school (%)	48 (20.9)
Primary school (%)	83 (36.1)
Illiterate (%)	28 (12.2)
Primary caregiver father education <sup>b</sup> (n = 175)	
Advanced school (%)	22 (12.6)
High school (%)	26 (14.9)
Secondary (%)	40 (22.9)
Primary school (%)	70 (40.0)
Illiterate (%)	17 (9.7)
Household Characteristics	
Median number of children (IQR)	1.0 (1.0, 2.0)
Annual household income , \$2000 US (%)	89 (35.5)
Access to phone (%) (n = 244)	241 (98.8)
No clean water at home (%)	108 (43.0)
No toilet at home (%)	128 (51.0)
Public transportation (bus or taxi) (%)	212 (84.5)
Median travel time (hours) from home to Hospital Bloom (IQR)	2.5 (1.5, 3.5)

<sup>a</sup>32 children excluded because <2 years of age and missing in 1 child;

<sup>b</sup>For 169 children, both mother and father were primary caregivers. Abbreviations: IQR, interquartile range; BMI, body mass index; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia. doi:10.1371/journal.pone.0043639.t001

## Local Standards of Care

Outpatients with fever who might have been neutropenic were instructed to call or go to Hospital Bloom as soon as possible and empiric broad-spectrum intravenous antibiotics were initiated in the emergency department or oncology ward after appropriate cultures were obtained. Antibiotic prophylaxis was not uniformly administered other than for patients with AML who received prophylactic vancomycin and ciprofloxacin starting in January 2008.

In terms of chemotherapy, patients with ALL diagnosed before October 2008 were treated according to the El Salvador- Guatemala-Honduras II protocol, which was based on the St Jude Total XIII [4] and

Total XV [5] protocols. Modifications included the use of only two risk groups (lower and higher), the omission of etoposide, and the administration of high dose methotrexate as a 3-hour infusion at a dose of 2 g/m<sup>2</sup> for lower-risk and 3 g/m<sup>2</sup> for higher-risk patients. After October 2008, patients were treated with AHOPCA-LLA 2008 which was based on ALL IC-BFM 2002. [6] Modifications included anthracycline omission for standard-risk patients, and administration of high dose methotrexate as a 4-hour infusion at a dose of 2 g/m<sup>2</sup> for standard- and intermediate-risk patients, and 5 g/m<sup>2</sup> for high-risk patients.

Patients with AML were treated with the AHOPCA-AML2007 protocol which was based on NOPHO-AML 93 [7] but with induction therapy according to BFM-AML 93. [8] Modifications included the treatment of all patients without stem cell transplantation, triple intrathecal therapy in each block of treatment and induction therapy with 8 days of cytarabine, 3 days of daunorubicin reduced by 66% and 3 days of etoposide (ADE). Patients with less than 5% bone marrow blasts at day 29 received a second course of ADE after hematological recovery. In April 2010, daunorubicin induction was reduced to 50% of the original BFM-AML 93 protocol, [8] etoposide was removed, and the fourth course of consolidation therapy was omitted for patients who had good response to the first induction treatment. Patients with acute promyelocytic leukemia (APL) were treated with AHOPCA-APL 2008, which was based on European APL 91 [9].

**Table 2.** *Knowledge and Barriers to Bringing Child to Hospital if Fever (N = 251)*

Characteristic	ALL N = 215	AML N = 36	Entire Cohort N = 251
What causes fever? <sup>a</sup>			
Being around sick people	3 (1.4)	1 (2.9)	4 (1.6)
Weather conditions	21 (9.8)	1 (2.9)	22 (8.8)
Food	16 (7.4)	4 (11)	20 (8.0)
Receiving chemotherapy	11 (5.1)	0 (0.0)	11 (4.4)
Low blood counts	29 (13)	3 (8.6)	32 (13)
Infection	139 (65)	21 (60)	160 (64)
How often do you have trouble bringing your child to hospital?			
Never	87 (40)	18 (50)	105 (42)
Rarely	33 (15)	9 (25)	42 (17)
Sometimes	88 (41)	9 (25)	97 (39)
Almost always	7 (3.3)	0	7 (2.8)
Always	0	0	0
What are reasons you don't call or go to the hospital if your child has fever and unknown counts?			
No way to get to the hospital	74 (34)	9 (25)	83 (33)
Child looks fine, no need to go	2 (0.9)	0	2 (0.8)
It doesn't matter (it's up to God)	0	0	0
What are barriers to bringing your child to hospital? <sup>a</sup>			
No one to watch other kids	9 (4.2)	1 (2.8)	10 (4.0)
Not enough money to travel	47 (21.9)	8 (22.2)	55 (22)
Cannot take time off work	2 (0.9)	0	2 (0.8)
Hospital too far away	2 (0.9)	0	2 (0.8)

<sup>a</sup>Patients could select more than one. Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia. doi:10.1371/journal.pone.0043639.t002

### Outcomes

Sepsis was defined as systemic inflammatory response syndrome in the presence of suspected or proven infection and organ dysfunction according to international consensus guidelines. [10,11] Invasive infection was defined as the occurrence of one or more cultures positive for a pathogen obtained from a usually sterile site. However,

positive cultures with common contaminants, such as coagulase negative *Staphylococcus*, required two positive cultures for the same organism or occurrence of sepsis to be considered a true infection [12,13].

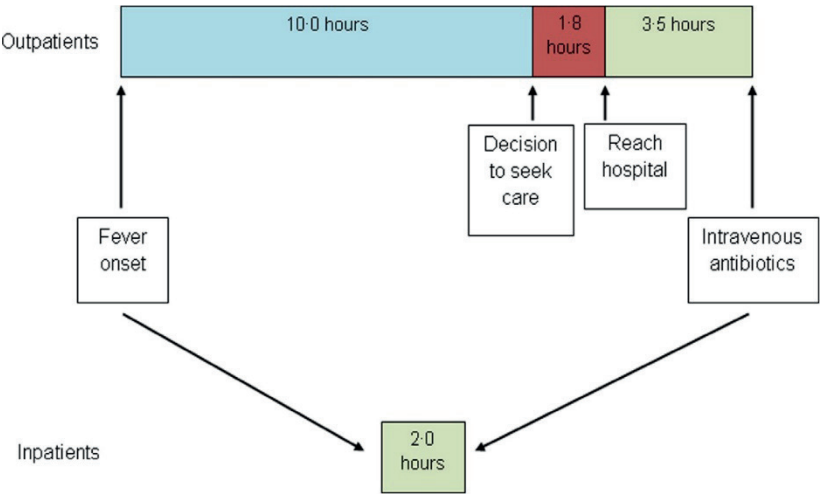
## Potential Predictors

Potential predictors of outcomes were categorized as demographic information of the child, parent and household; characteristics at episode onset; and knowledge and barriers as measured at the baseline (first) interview that was conducted within one month of diagnosis. Child demographics were gender, age, and diagnosis (AML vs. ALL). Parental education was dichotomized as illiterate compared with at least primary school education. Household features included \$ or, US\$2000 annual household income, which was chosen a priori based upon our previous studies. [2,14] Other household features evaluated included the availability of clean water and a toilet at home, method of transportation (public vs. private) and travel time in hours to Hospital Bloom. Features recorded at the onset of each febrile episode included maximum temperature, neutropenia, presence of a central venous line and whether the family had a thermometer at home. Items included in regression modeling from the survey of knowledge and barriers were: belief that fever was caused by weather or food; not going to the hospital if fever develops because lacked means to travel; have trouble bringing child to Hospital Bloom at least sometimes (on a five-point Likert scale where 1= never and 5 = always have trouble); and lack of money is a barrier to bringing the child to hospital. For the outcomes of sepsis and infectious deaths, we also included three time intervals as potential predictors for outpatients: hours from fever onset to decision to seek medical care; hours from decision to seek care to hospital visit; and hours from hospital visit to intravenous antibiotics.

**Table 3.** *Characteristics of the Febrile Episode Stratified by Inpatient Versus Outpatient Status (N = 379)*

Characteristic	Inpatients N = 110	Outpatients N = 269
Characteristics at Onset of Episode		
Median days from leukemia diagnosis (IQR)	0.5 (24.0, 70.0)	162.0 (69.0, 356.0)
Median maximum temperature in uC (IQR)	39.3 (38.8, 39.5)	39.3 (38.7, 39.5)
Median white blood cell count x10 <sup>9</sup> (IQR)	2.0 (0.9, 4.8)	2.0 (0.8, 4.6)
Absolute neutrophil count, 0.56109 (%)	67 (60.9)	126 (46.8)
Central venous line present (%)	42 (38.2)	28 (10.4)
Fever Practices at Home		
Family does not own a thermometer (%)	77 (70.0)	120 (44.6)
Phone contact with healthcare professional because of fever (%)		54 (22.2)
Antibiotics taken at home before hospital (%)		18 (6.7)
Timeline from Fever to Antibiotic Administration		
Median hours from fever onset to hospital visit (IQR) <sup>a</sup>		12.5 (6.0, 24.0)
Median hours from fever onset to decision to seek medical care (IQR) <sup>b</sup>		10.0 (5.0, 20.0)
Median hours from decision to seek medical care to hospital visit (IQR) <sup>c</sup>		1.8 (1.0, 3.0)
Median hours from hospital visit to intravenous antibiotic administration (IQR) <sup>d</sup>		3.5 (2.2, 5.5)
Median hours from hospital visit to obtaining complete blood count (IQR) <sup>e</sup>		1.0 (0.5, 2.7)
Median hours from fever onset to intravenous antibiotic administration (IQR) <sup>f</sup>	2.0 (0.8, 5.0)	16.0 (8.3, 26.0)
Episode Outcomes		
Microbiologically documented infection (%)	19 (17.3)	19 (7.1)
Clinically documented infection (%)	19 (17.3)	89 (33.1)
Sepsis (%)	24 (21.8)	47 (17.5)
Infection-related mortality (%)	4 (3.6)	7 (2.6)
Intensive care unit (%)	14 (12.7)	21 (7.8)
Missing: <sup>a</sup> n = 18, <sup>b</sup> n = 24, <sup>c</sup> n = 25, <sup>d</sup> n = 28, <sup>e</sup> n = 20, <sup>f</sup> n = 3 for inpatients and n = 13 for outpatients. Abbreviation: IQR – interquartile range.		

**Figure 1.** Median times from fever onset to receipt of intravenous antibiotics among outpatients and inpatients



**Table 4.** Factors Associated with Longer Time from Initial Fever to Decision to Seek Medical Care and from Decision to Seek Care to First Hospital Visit among Outpatient Episodes (N = 269)

Characteristic	Hours from Fever Onset to Decision to Hours From Decision to Seek Care to Reach					
	Seek Care*			Hospital**		
	b	SE	P Value	b	SE	P Value
Child/Household Characteristics						
Child Male	3.84	3.16	0.227	0.24	0.22	0.266
Child Age	0.04	0.46	0.938	20.02	0.03	0.625
AML vs. ALL	22.34	8.31	0.779	20.10	0.59	0.870
Mother Illiterate	11.55	5.23	0.029	0.001	0.37	0.998
Father Illiterate	15.54	6.27	0.015	20.02	0.44	0.956
Annual Household Income , \$2000	2.62	3.45	0.450	0.33	0.24	0.175
No Clean Water at Home	21.66	3.20	0.605	0.65	0.22	0.003
No Toilet at Home	0.42	3.16	0.894	0.67	0.21	0.002
Public Transportation (bus or taxi)	5.87	4.08	0.153	0.27	0.29	0.346
Travel time to Hospital Bloom (hours)	1.01	1.09	0.356	0.30	0.07	> 0.0001
Characteristics at Episode Onset						



Maximum Temperature (per uC)	26.08	1.44	>.0001	0.12	0.09	0.192
Neutropenia (ANC ,0.56109)	1.42	2.93	0.630	20.04	0.18	0.816
Central Venous Line Present	0.91	4.74	0.848	20.02	0.29	0.937
Family Does Not Own a Thermometer	3.26	3.00	0.280	0.18	0.19	0.358
Knowledge and Barriers						
Causes of Fever						
Weather conditions	21.37	4.74	0.773	20.25	0.34	0.455
Food	27.68	6.08	0.209	20.33	0.42	0.428
Don't Go to Hospital Because No Way to Get to Hospital	2.14	3.26	0.513	0.28	0.23	0.220
Have Trouble Bringing Child to Hospital at least Sometimes	4.89	3.17	0.126	0.61	0.22	0.005
Barrier to Bringing Child - Money	21.31	3.89	0.735	0.91	0.26	0.001

*Abbreviations:* ALL - acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia; ANC – absolute neutrophil count.

*\*Time* Fever to Seek Care = time from fever onset to decision to seek care.

*\*\*Time* Seek Care to Hospital = time from decision to seek care to reach Hospital Bloom. doi:10.1371/journal.pone.0043639.t004

## Statistics

Given the fundamental differences expected between inpatients and outpatients, all analyses were stratified by location at onset of fever. In order to identify factors associated with times to presentation and treatment, we conducted a repeated measures linear regression using Proc Mixed in SAS. Determination of factors associated with sepsis and infectious mortality were conducted with repeated logistic regression analysis using generalized estimating equations. These approaches were used in order to account for each child contributing multiple episodes and to adjust for any potential correlation between episodes within an individual child. Multiple regression was planned for sepsis and infectious mortality including variables significant in univariate analysis. All tests of significance were two-sided, and statistical significance was defined as P<0.05. Statistical analyses were performed using the SAS statistical program (SAS-PC, version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC).

**Table 5. Factors Associated with Sepsis and Infectious Deaths among Outpatient Episodes (N = 269)**

Characteristic	Sepsis		(n = 47)		Infection		Death (n = 7)*	
	OR	P Value	95% CI	P Value	OR	95% CI	P Value	P Value
Child/Household Characteristics								
Child Male	0.95		0.47, 1.90	0.875	0.43	0.08, 2.27	0.317	
Child Age	0.98		0.89, 1.09	0.742	0.97	0.71, 1.32	0.828	
AML vs. ALL	2.09		0.57, 7.72	0.267	4.69	0.38, 58.26	0.230	
Mother Illiterate	3.06		1.09, 8.63	0.034	3.63	0.73, 17.95	0.114	
Father Illiterate	0.54		0.13, 2.18	0.384	2.26	0.24, 21.72	0.480	
Annual Household Income , \$2000	1.02		0.45, 2.31	0.966	13.90	1.62, 119.10	0.016	
No Clean Water at Home	0.69		0.34, 1.43	0.318	1.76	0.38, 8.12	0.470	
No Toilet at Home	1.00		0.50, 1.98	0.992	2.05	0.38, 10.95	0.402	
Public Transportation (bus or taxi)	1.41		0.53, 3.73	0.488	**			
Travel time to Hospital Bloom (hours)	1.07		0.90, 1.27	0.461	1.36	1.03, 1.81	0.031	
Characteristics at Episode Onset								
Maximum Temperature in uC	1.45		0.86, 2.45	0.159	0.57	0.23, 1.42	0.229	
Neutropenia (ANC ,0.56109)	1.86		0.96, 3.63	0.067	2.91	0.56, 15.12	0.203	
Central Venous Line Present	2.53		1.08, 5.94	0.033	**			
Family Does Not Own a Thermometer	0.90		0.46, 1.80	0.772	1.68	0.37, 7.68	0.505	
Knowledge and Barriers								
Causes of Fever								
Weather conditions	2.64		1.06, 6.62	0.038	1.16	0.16, 8.42	0.886	
Food	2.02		0.45, 8.98	0.356	5.12	1.08, 24.28	0.040	
Don't Go to Hospital Because No Way to Get to Hospital	0.73		0.35, 1.51	0.394	0.65	0.12, 3.49	0.614	

Have Trouble Bringing Child to Hospital at least Sometimes	1.04	0.51, 2.11	0.924	0.87	0.19, 4.02	0.863
Barrier to Bringing Child - Money	1.24	0.55, 2.77	0.607	1.58	0.29, 8.73	0.602
Times to Assessment and Treatment						
Hours fever onset to decision to seek medical care	1.01	0.99, 1.02	0.495	1.00	0.95, 1.05	0.925
Hours from decision to seek medical care to hospital visit	1.01	0.84, 1.23	0.890	0.74	0.38, 1.44	0.375
Hours from hospital visit to intravenous antibiotics	0.79	0.63, 0.99	0.041	1.02	0.80, 1.28	0.889
<i>Abbreviations:</i> ALL - acute lymphoblastic leukemia; AML - acute myeloid leukemia; ANC - absolute neutrophil count; OR - odds ratio.						
<i>*These results should be viewed very cautiously as there were only 7 infectious deaths among outpatients.</i>						
<i>**OR not estimable because all 7 infectious deaths occurred in children taking public transportation and in those who did not have a central venous line.</i> doi:10.1371/journal.pone.0043639.t005						

## Results

Between May 1, 2008 and March 31, 2011, 254 potentially eligible children with acute leukemia presented to Hospital Bloom. One was not approached as the patient was unwell and died before consent could be obtained, one did not have a competent legal guardian and one refused participation; thus, 251 children with de novo ALL and AML were enrolled. Child, parent and household characteristics are illustrated in Table 1. Most children had ALL (215, 85.7%) and among these children, 175 (81.4%) were treated with AHOPCA LLA 2008. Among the children with AML, 30 (83.3%) were treated with AHOPCA LMA 2007.

Table 2 illustrates knowledge and barriers related to fever care among parent respondents; these responses were obtained at the initial interview within one month of diagnosis. Most parents knew that infection can cause fever although 8.8% thought that fever could be caused by the weather and 8.0% thought that fever could be caused by certain foods. Eight-five participants selected "other" as a cause of fever, and listed leukemia (n= 47), trauma (n=2), allergies (n= 4) insect bites (n= 2), pollution (n=3), dust, dirt or contamination (n= 10), and miscellaneous/not specified (n= 17) as the potential cause. In total, 104 (41.4%) said that they sometimes, almost always or always had difficulty travelling to the hospital if their child had fever. The main reason that parents would not go to the hospital if their child had fever was because they had no way to travel to the hospital. The most common barrier to bringing their child to hospital was lack of money.

During the study period, 47 (18.7%) relapsed and 18 (7.2%) abandoned therapy during the observation period and thus, were no longer observed for infection outcomes after those events. There were 379 febrile episodes that occurred during treatment; 110 in inpatients and 269 in outpatients. Table 3 illustrates characteristics at the onset of the episode, fever practices at home, times to seek care, presentation to hospital and receipt of intravenous antibiotics (Figure 1) and episode outcomes. Among outpatients, the major source of delay is time from fever onset to decision to seek care with 75%

of participants waiting for 5 hours or more. Once the decision to seek care had been made, the median time to reach the hospital was 1.8 hours. In total, there were 71 (18.7%) episodes of sepsis and 11 (2.9%) infectious deaths.

Table 4 illustrates factors associated with longer time from initial fever to decision to seek medical care and time from decision to seek care to Hospital Bloom among outpatient episodes. Parents who were illiterate had a 12 to 16 hour delay in deciding to seek medical care compared to parents who were literate. Once the decision to seek medical care had been made, parental literacy did not influence time to first hospital visit. Rather, anticipated travel time to Hospital Bloom, lack of clean water and no toilet at home were associated with longer time to reach hospital. Parents who stated that they had trouble travelling to the hospital and that lack of money was a barrier to travel had a greater delay in reaching the hospital. Table S1 describes factors associated with longer time from first hospital visit to intravenous antibiotics among outpatient and from fever to intravenous antibiotics among inpatient episodes. Among inpatients, those with AML had shorter time to first antibiotics.

Table 5 illustrates factors associated with sepsis and infectious deaths among outpatient episodes. The following factors were significantly associated with sepsis: maternal illiteracy (OR 3.06, 95% CI 1.09 to 8.63;  $P=0.034$ ), central line (OR 2.53, 95% CI 1.08 to 5.94;  $P=0.033$ ), and belief about weather as a cause of fever (OR 2.64, 95% CI 1.06 to 6.62;  $P=0.038$ ). The following factors were significantly associated with infectious death: annual household income, US\$2000 (OR 13.90, 95% CI 1.62 to 119.10;  $P=0.016$ ), anticipated travel time to Hospital Bloom (OR 1.36, 95% CI 1.03 to 1.81;  $P=0.031$ ) and belief about food as a cause of fever (OR 5.12, 95% CI 1.08 to 24.28;  $P=0.040$ ). Time to reach hospital was not predictive of sepsis or infectious death.

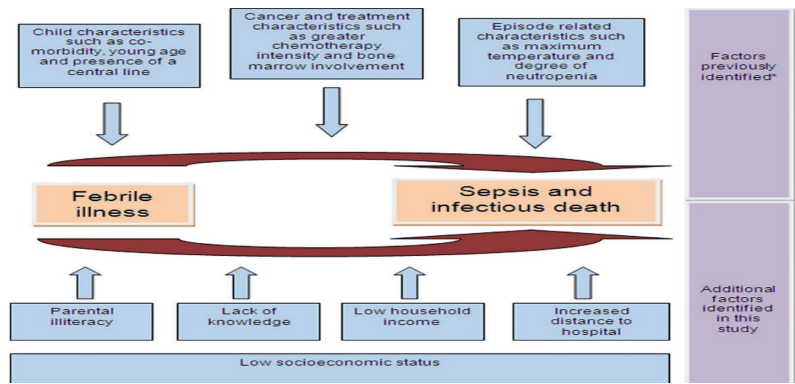
In the multiple regression analysis of sepsis, maternal illiteracy, presence of a central line and belief that weather causes fever were examined. Each factor was independently associated with sepsis: maternal illiteracy (OR 3.17, 95% CI 1.24 to 8.11;  $P=0.016$ ), cen-

tral line (OR 2.88, 95% CI 1.25 to 6.64; P =0.013), and belief about weather as a cause of fever (OR 2.67, 95% CI 1.22 to 5.85; P =0.014). Time from hospital visit to antibiotic administration was not included since shorter time intervals were most likely due to sepsis at the time of presentation rather than a cause of sepsis. Multiple regression was not conducted for infection-related mortality because there were only 7 events.

Table S2 describes factors associated with sepsis among inpatients. Higher maximum temperature and neutropenia were significant predictors of sepsis in the inpatient setting whereas time to antibiotic initiation was not predictive. Analysis of infectious deaths was not presented since there were only 4 inpatient deaths. Figure 2 summarizes how the findings from this study contribute to our understanding of risk factors for sepsis and infectious deaths in children with acute leukemia in LMIC.

The qualitative comments reflected similar findings. Parents identified lacking transportation, delays during travel (for example transit strikes and inclement weather) and long emergency room wait times as reasons for longer times to antibiotic treatment.

**Figure 2.** Factors associated with sepsis and infectious deaths in pediatric acute leukemia in low/middle income countries\*. Based on a systematic review in pediatric oncology. Factors listed are illustrative and not meant to be exhaustive. [20]



## Discussion

In this prospective study of children with acute leukemia in El Salvador, we found that parental illiteracy was associated with delays in deciding to seek care for fever. We also identified those with longer travel time to hospital once the decision to seek care had been made; these were children who had an anticipated longer travel time to Hospital Bloom, parental anticipation of having difficulty bringing their child to hospital, and parental perception that lack of money is a barrier to travel. Together, these findings suggest that poor socioeconomic status influences delays in deciding to seek care and reaching the hospital for febrile children with leukemia.

We also found that maternal illiteracy was associated with sepsis while low household income and longer anticipated travel time to Hospital Bloom were associated with infectious mortality. These findings similarly suggest that poor socioeconomic status influences severe outcomes of fever in children with leukemia. An association between illiteracy and poor health outcomes has been demonstrated in other clinical settings and in particular, lack of literacy has been associated with poor compliance in a variety of clinical conditions [15–18] and worse outcomes. [19] However, our study suggests that one important mechanism by which illiteracy and poverty may worsen infection outcomes in LMIC is by delaying time to treatment for fever.

While low socioeconomic status was associated with delays in times to treatment for fever and with severe fever outcomes, time from fever to hospital presentation was not associated with sepsis or infectious mortality directly. It is possible that delays in receiving treatment for fever are not associated with sepsis or infectious mortality. More likely, the relationship between socioeconomic status, delays to treatment and fever outcomes is not linear but rather, complex and confounded by multiple factors. An important confounder that we could not measure is infection severity. For example, from the current analysis, those with sepsis had a shorter time to first antibiotics once they had reached the hospital. By analogy, children who were more ill may have had parents who decided to seek medi-

cal care earlier and who reached hospital sooner. Consequently, it is not surprising that we failed to show an association between time to hospital and sepsis or mortality.

This study is important because we provide one example of how to assess barriers to health in children with severe/chronic conditions in LMIC. Most children with cancer live in LMIC and interventions that can improve survival for these children will be impactful. Interventions should be considered that focus in at least two different directions. First, our findings suggests that targeted educational strategies for illiterate parents to seek care early and to define ahead of time the plan for transportation to the hospital should fever occur could reduce death from infection in LMIC. Provision of accommodation such as a nearby guest house during periods of neutropenia for the highest risk children should also be considered. Second, interventions such as antibiotic prophylaxis or oral antibiotics while travelling to the hospital may be considered although the impact on antibiotic resistance is an important issue.

A major strength of our study was the use of a prospective observational design to collect information at multiple time points; such a design was critical to achieving our objectives. A second strength was the recruitment of large numbers of children with acute leukemia with similar anti-cancer treatment. However, our results must be interpreted in light of its limitations. Our study is limited by its observational nature and there are many potential confounders that could not be measured such as infection severity at the onset of fever. Second, it is not clear how generalizable these findings are outside of El Salvador. However, we have no a priori reason to believe that findings would be substantially different in other nations with similar healthcare systems and economics. Finally, there were 7 outpatient infectious deaths and thus, the power of this analysis was limited.

In conclusion, illiteracy and poverty are associated with delays in treatment of fever and with sepsis and infectious mortality in pediatric leukemia in the LMIC of El Salvador. Future work should focus on reducing times to treatment for febrile children and identifying



strategies to decrease sepsis and infectious mortality that target children of low socioeconomic status.

**Acknowledgments.** We wish to thank Amanda Alli for assistance with data management and Tanya Hesser for editorial assistance.

**Author Contributions.** Conceived and designed the experiments: LS RG SLF RV MB MCE CD MC SCH. Performed the experiments: LS RG SLF RV MB MCE CD MC SCH. Analyzed the data: LS. Contributed reagents/materials/analysis tools: LS RG SLF RV MB MCE CD MC SCH. Wrote the paper: LS RG SLF RV MB MCE CD MC SCH.

## References

1. Ribeiro RC, Steliarova-Foucher E, Magrath I, Lemerle J, Eden T, et al. (2008) Baseline status of paediatric oncology care in ten low-income or mid-income countries receiving My Child Matters support: a descriptive study. *Lancet Oncol* 9: 721–729.
2. Gupta S, Bonilla M, Fuentes SL, Caniza M, Howard SC, et al. (2009) Incidence and predictors of treatment-related mortality in paediatric acute leukaemia in El Salvador. *Br J Cancer* 100: 1026–1031.
3. Gupta S, Bonilla M, Gamero M, Fuentes SL, Caniza M, et al. (2011) Microbiology and mortality of pediatric febrile neutropenia in El Salvador. *J Pediatr Hematol Oncol* 33: 276–280.
4. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, et al. (2004) Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 104: 2690–2696.
5. Pui CH, Relling MV, Sandlund JT, Downing JR, Campana D, et al. (2004) Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 83: S124–126.

6. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, Chik KW, Castillo L, et al. (2008) Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* 22: 989–997.
7. Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, Forestier E, Hasle H, et al. (2003) Treatment stratification based on initial in vivo response in acute myeloid leukaemia in children without Down syndrome. Results of NOPHO-AML trials. *Br J Haematol* 122: 217–225.
8. Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, Reinhardt D, Hermann J, et al. (2001) Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Munster 93. *J Clin Oncol* 19: 2705–2713.
9. Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, Archimbaud E, Chomienne C, et al. (1993) Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. *Blood* 82: 3241–3249.
10. Goldstein B, Giroir B, Randolph A (2005) International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 6: 2–8. 11.
11. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29: 530–538.
12. Bouza E, Cobo-Soriano R, Rodriguez-Creixems M, Munoz P, Suarez-Leoz M, et al. (2000) A prospective search for ocular lesions in hospitalized patients with significant bacteremia. *Clin Infect Dis* 30: 306–312.
13. Chirouze C, Schuhmacher H, Rabaud C, Gil H, Khayat N, et al. (2002) Low serum procalcitonin level accurately predicts the

absence of bacteremia in adult patients with acute fever. *Clin Infect Dis* 35: 156–161.

14. Bonilla M, Rossell N, Salaverria C, Gupta S, Barr R, et al. (2009) Prevalence and predictors of abandonment of therapy among children with cancer in El Salvador. *Int J Cancer* 125: 2144–2146.
15. Gellad WF, Grenard JL, Marcum ZA (2011) A systematic review of barriers to medication adherence in the elderly: looking beyond cost and regimen complexity. *Am J Geriatr Pharmacother* 9: 11–23?
16. Nam S, Chesla C, Stotts NA, Kroon L, Janson SL (2011) Barriers to diabetes management: patient and provider factors. *Diabetes Res Clin Pract* 93: 1–9.
17. Seliverstov I (2011) Practical management approaches to anti-coagulation noncompliance, health literacy, and limited English proficiency in the outpatient clinic setting. *J Thromb Thrombolysis* 31: 321–325.
18. Murray MD, Tu W, Wu J, Morrow D, Smith F, et al. (2009) Factors associated with exacerbation of heart failure include treatment adherence and health literacy skills. *Clin Pharmacol Ther* 85: 651–658.
19. Berkman ND, Sheridan SL, Donahue KE, Halpern DJ, Crotty K (2011) Low health literacy and health outcomes: an updated systematic review. *Ann Intern Med* 155: 97–107.
20. Phillips B, Wade R, Stewart LA, Sutton AJ (2010) Systematic review and metaanalysis of the discriminatory performance of risk prediction rules in febrile neutropaenic episodes in children and young people. *Eur J Cancer* 46: 2950–2964.

# Outcome of Children Treated for Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia in Central America

DOI: 10.1002/cncr.27846, Received: June 11, 2012; Revised: August 16, 2012; Accepted: September 10, 2012, Published online November 16, 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Corresponding author: Lillian Sung, MD, PhD, Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, 555 University Avenue, Toronto, Ontario, M5G 1X8 Canada; Fax: (416) 813-5979; [lillian.sung@sickkids.ca](mailto:lillian.sung@sickkids.ca)

Stacey Marjerrison, MD<sup>1</sup>

Federico Antillon, MD, PhD<sup>2</sup>

Ligia Fu, MD<sup>3</sup>

Roxana Martinez, MD<sup>4</sup>

Roberto Vasquez, MD<sup>5</sup>

Miguel Bonilla, MD<sup>5</sup>

Scott C. Howard, MD, MSc<sup>6</sup>

Lillian Sung, MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; <sup>2</sup>National Pediatric Oncology Unit, Guatemala City, Guatemala; <sup>3</sup>Pediatric Oncology, Hospital Escuela, Tegucigalpa, Honduras; <sup>4</sup>Hospital Mario Catarino Rivas, San Pedro Sula, Honduras; <sup>5</sup>Pediatric Oncology, Benjamin Bloom National Children's Hospital, San Salvador, El Salvador; <sup>6</sup>St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee.

**Background.** Outcomes for relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) have not been documented in resource-limited settings. This study examined survival after relapse for children with ALL in Central America.

**Methods.** A retrospective cohort study was performed and included children with first relapse of ALL in Guatemala, Honduras, or El Salvador between 1990 and 2011. Predictors of subsequent event-free survival (EFS) and overall survival (OS) were examined.

**Results.** There were 755 children identified with relapsed disease. The median time from diagnosis to relapse was 1.7 years (interquartile range, 0.8-3.1 years). Most relapses occurred during (53.9%) or following (24.9%) maintenance chemotherapy, and the majority occurred in the bone marrow (63.1%). Following the initial relapse, subsequent 3-year EFS ( $\pm$  standard error) and OS were  $22.0\% \pm 1.7\%$ , and  $28.2\% \pm 1.9\%$ , respectively. In multivariable analysis, worse post relapse survival was associated with age  $\pm 10$  years, white blood cell count  $\pm 50 \pm 109/L$ , and positive central nervous system status at the original ALL diagnosis, relapse that was not isolated central nervous system or testicular, and relapse  $< 36$  months following diagnosis. Site and time to relapse were used to identify a favorable risk group whose 3-year EFS and OS were  $50.0\% \pm 8.9\%$  and  $68.0\% \pm 8.1\%$ , respectively.

**Conclusions.** Prognosis after relapsed ALL in Central America is poor, but a substantial number of those with favorable risk features have prolonged survival, despite lack of access to stem cell transplantation. Stratification by risk factors can guide therapeutic decision-making.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia, relapse, child, low-income country, middle-income country, developing country.

## Introduction

Outcomes for children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) have greatly improved in recent decades in high-income countries (HIC), where 76% to 86%<sup>1</sup> survive without recurrence. When relapse occurs among children with ALL, overall survival (OS) in HIC is generally 15% to 50%, depending on relapse and initial disease features.<sup>2-8</sup> In this setting, the most important factors associated with poor OS after relapse include duration of remission prior to relapse (worse for relapses less than 12, 18, or 36 months after diagnosis), bone marrow site of relapse, and T cell disease.<sup>2-8</sup>

In low- and middle-income countries (LMIC) such as those in Central America, outcomes have been worse than in HIC. A recent study of pediatric ALL in El Salvador demonstrated a 5-year event-free survival (EFS) of 56% among those with standard-risk ALL and 49% among those with high-risk ALL.<sup>9</sup> However, in LMIC, the outcomes following relapse and factors that predict subsequent EFS after relapse have not been documented. Knowledge of outcomes following relapse and predictors of relapse are important, because this information may suggest children in whom aggressive retreatment may be considered and others where a palliative approach would be more appropriate. Furthermore, some variables may be unique to the LMIC setting such as relapse following abandonment of therapy.

Our objectives were to describe EFS and OS among children with first relapse of ALL in Guatemala, Honduras, and El Salvador, and to identify predictors of subsequent EFS and OS.

## Materials and methods

### Study Population and Setting

Research ethics approval was obtained from The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada, and at each participating center. The patient sample was derived from 4 primary centers in 3 Central American countries, namely Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom in San Salvador, El Salvador; Unidad Nacional de Oncología Pediátrica in Guatemala City, Guatemala; Hospital Escuela in Tegucigalpa, Honduras; and Hospital Rivas in San Pedro Sula, Honduras. These centers and their satellites provide the majority of pediatric oncology care in their respective countries, and typically treat 315 children with ALL per year combined. The patient sample included children with relapsed ALL who were younger than 20 years at initial diagnosis, and who experienced a first relapse of their ALL between September 15, 1990, and April 30, 2011. Exclusion criteria included L3 ALL and induction failure as a first event.

Initial therapeutic regimens varied by site and time period. Prior to 2000, each site used different protocols. Subsequently, the vast majority of patients at each of the 3 countries were treated according to common clinical management protocols: the GHS LLA 2000 from 2000 to 2007 (all sites), and the LLAG-2007 (Guatemala) or the AHOPCA LLA-2008 (El Salvador and Honduras) from 2007 and/or 2008 forward. The GHS LLA 2000 protocol was based on the St. Jude Total XIIIB10 and Total XV11 backbones. Important modifications included the omission of etoposide, changing the high-dose methotrexate to 2 g/m<sup>2</sup> for standard-risk and 3 g/m<sup>2</sup> for high-risk patients, each infused over 3 hours, and the use of only 2 risk groups (standard and high). Standard-risk patients were defined as those aged 1 to <10 years at diagnosis who presented with an initial white blood cell count (WBC) of  $<50 \geq 109/L$ , DNA index 1.16, and the absence of any high-risk features (central nervous system [CNS] or testicular involvement, T cell immunophenotype, M3 bone marrow on day 15, or M2/M3 bone marrow on day 36). The 2007/2008 protocols were

both based on the ALL IC-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) 2002 Trial,<sup>12</sup> with the major modifications including the omission of etoposide in both the LLAG-2007 and the AHOPCA LLA- 2008 trials, the omission of daunorubicin in induction, and omission of a phase 1b block during remission induction (cyclophosphamide, cytarabine, and mercaptopurine) for standard-risk patients in the AHOPCA LLA- 2008 study. Both studies used 3 risk groups (standard, intermediate, and high) to stratify patients. Standard-risk was defined as B lineage ALL, patient aged 1 to 6 years, initial WBC  $< 20 \geq 109/L$ , and absence of high-risk features (T cell immunophenotype, age  $< 1$  year at diagnosis, CNS 3 disease, testicular infiltration, day 8 prednisone response with blasts  $\geq 1 \geq 109/L$ , day 15 M3 marrow, day 33 M2/M3 marrow, high-risk translocation [t(4;11), t(9;11), t(1;19)], or hypodiploidy [ $< 45$  chromosomes]). Intermediate risk was defined as B lineage ALL, with age  $> 6$  years or WBC count  $\geq 20 \geq 109/L$ , and absence of high-risk features.

When relapse occurred, therapeutic regimens varied considerably. In some cases, patients were managed with palliative intent, whereas in others, curative therapy was pursued using a variety of different relapse regimens. Notably, hematopoietic stem cell transplantation was not available, nor were clofarabine or forms of asparaginase other than native *E. coli* asparaginase. Management of relapse with palliative intent was defined as initiation of palliative therapy within 1 week of the date of relapse diagnosis.

The care at each of the centers was provided at no financial cost to the families. Accommodation, subsidized transportation, and food were provided free of charge for families that lived far from the hospital in order to reduce abandonment of therapy. To further reduce abandonment, clinic social workers contacted, by telephone and home visits, those families who did not adhere to clinic visits. Funding for these programs was provided by local nongovernmental organizations and international partnerships.



## Data Source

The data source was the Pediatric Oncology Networked Database (POND) ([www.pond4kids.org](http://www.pond4kids.org)). POND is an online, multilingual clinical database created by the International Outreach Program at St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, to meet the needs of oncology centers in LMIC for cancer registration, outcome monitoring, and quality improvement.<sup>13</sup> In addition, data can be anonymously shared for research purposes, as was done for this study. The data contained within POND were abstracted from patient charts in real time by trained data managers at each of the sites, and confirmed by the treating oncologists. An audit of POND data from Honduras showed that the accuracy for basic data fields was 99%.<sup>14</sup>

## Outcome and Predictor Variables

The primary outcomes were EFS and OS after relapse. EFS was calculated from the time of first relapse until the next event or date of last contact. Events included subsequent relapse, second malignant neoplasm, treatment refusal, abandonment (at least 4 consecutive weeks of missed appointments during active therapy), or death. OS was calculated based on the time from first relapse until death or last contact.

Potential predictors of survival were derived from variables shown to be associated with outcome in studies of relapsed ALL in the HIC setting, as well as variables considered to be possibly important in the LMIC setting. The following variables at diagnosis were examined: age  $\geq 10$  years, race, initial WBC  $\geq 50 \geq 109/L$ , DNA index, B versus T lineage, CNS status, and disease risk category. CNS positivity was defined as CNS 3 status, whereas CNS 1 and CNS 2 were considered CNS-negative.

Relapse characteristics included time to relapse, site of relapse, and phase of therapy at relapse. Particular to this setting, abandonment of therapy has affected outcome in Central America,<sup>9</sup> and thus abandon-

ment of therapy prior to relapse was also considered. Finally, diagnosis time period was examined, as defined by changes in the common treatment protocols (1990-1999, 2000-2007, and 2008-2011).

## **Statistical Analysis**

Survival was described with the Kaplan-Meier method. The association between factors at initial diagnosis and relapse and subsequent EFS and OS was analyzed using the Cox proportional hazards model. Variables significant in univariate analysis were included in multivariable models. From the variables independently associated with survival in multivariable analyses, a favorable risk group was created that used a minimum number of variables in order to simplify adoption and to be relevant to a larger number of children. All statistical analyses were performed using the SAS statistical program (SAS-PC, version 9.3; SAS Institute, Cary, NC). All tests of significance were 2-sided, and statistical significance was defined as  $P < .05$ .

## **Results**

During the study period, there were 759 children with relapsed ALL who were identified. One patient with mature B cell leukemia and 3 who experienced induction failure were excluded, and the remaining 755 patients were analyzed. Demographic characteristics of the patient population can be seen in Table 1. The majority of relapses (63.1%) occurred in the bone marrow. The most common phases of therapy in which relapse occurred was during maintenance (50.5%) and following completion of therapy (24.5%).

There were 103 patients managed with palliative intent following first relapse. Among patients who did not experience another event, the median follow-up time was 1.9 years (interquartile range [IQR], 0.6-4.9 years). At 3 years, EFS  $\pm$  standard error after relapse for the entire cohort was  $22.0\% \pm 1.7\%$  and OS after relapse was  $28.3\% \pm 1.9\%$  (Fig. 1). Death, treatment refusal, and abandonment typically occurred within the first 6 months after relapse (Table 2), but

the median time to second relapse, when it occurred as the second event, was 10.5 months (IQR, 5-24 months). A total of 139 patients experienced a second relapse: 118 subsequently died and 21 were alive at the last patient encounter (median follow-up of 7 months; range, 1-46 months). All patients who abandoned therapy after relapse subsequently died. The most frequent cause of death was progressive disease (70.3%). At 3 years, post relapse EFS and OS for patients treated with curative intent (defined as those who did not start palliative treatment within 1 week of relapse diagnosis) and patients who did not abandon therapy after relapse were  $26.2\% \pm 2.0\%$  and  $31.5\% \pm 2.1\%$ .

**Table 1.** *Demographics of Children With First Relapse of Acute Lymphoblastic Leukemia in Central America (N ¼ 755)*

Characteristic at Diagnosis or Relapse	Value
Characteristics at Initial Diagnosis	
Median age y (IQR)	7.11 (4.0-10.6)
Male n (%)	472 (62.5)
Race n (%) N = 746	
Hispanic	223 (29.9)
Indigenous	69 (9.3)
Caucasian	6 (0.8)
Mixed race	448 (60.1)
Initial WBC $\geq 50 \times 10^9/L$ n (%),N = 661	168 (25.4)
High DNA index ( $\geq 1.16$ ) n (%) N = 476	74 (15.5)
Histology n (%) N = 714	
B lineage	641 (89.8)
T lineage	73 (10.2)
Central nervous system status n (%) N = 678	
CNS 1	585 (86.3)
CNS 2	52 (7.7)

CNS 3	41 (6.1)
Risk category <sup>a</sup> n (%) N=702	
Standard	233 (33.2)
Intermediate	55 (7.8)
High or very high	414 (60.0)
Diagnosis time period n (%)	
1990-1999	118 (15.6)
2000-2007	501 (66.4)
2008-2011	136 (18.0)
Characteristics at Relapse	
Median years to first relapse (IQR)	1.66 (0.8-3.0)
Site of first relapse n (%) N=721	
Bone marrow	455 (63.1)
Central nervous system	159 (22.0)
Testicular	31 (4.3)
Other (extramedullary) <sup>b</sup>	11 (1.5)
Combined sites <sup>b</sup>	65 (9.0)
Phase of therapy at first relapse n (%)	
Consolidation/intensification	76 (10.1)
Maintenance	381 (50.5)
Follow-up	185 (24.5)
Abandoned	113 (15.0)

Abbreviations: CNS, central nervous system; IQR, interquartile range; n, number in each category; N, number at risk and only displayed when missing data; WBC, white blood cell count.

<sup>a</sup> Risk category assignment as per protocol, see text for full description.

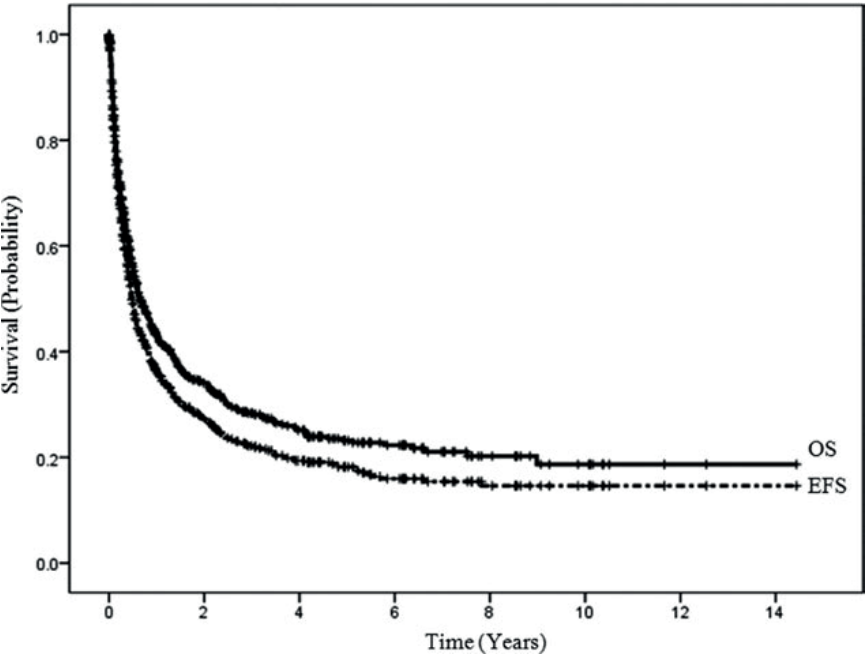
<sup>b</sup> Other includes chloroma, spleen, pleura, ovary, and thorax. Combined means any combination of sites.

Factors associated with EFS and OS following a first relapse, in univariate analysis, are illustrated in Table 3. Worse EFS and OS was observed in children who had presented initially with T lineage ALL; age  $\geq 10$  years; WBC  $\geq 50 \times 10^9/L$ ; DNA index  $< 1.16$ ; positive CNS status; intermediate-, high-, or very high-risk disease; and those diagnosed in the latest time period of therapy. Relapse characteristics associated with worse survival were relapse earlier than 36 months after diagnosis, and relapse site that was not isolated CNS or testicular. Children who experienced a relapse without previous abandonment of therapy did not have worse EFS or OS, compared with those who relapsed after abandonment.

Variables included in multivariable analysis were age  $\geq 10$  years at diagnosis, WBC  $\geq 50 \times 10^9/L$  at diagnosis, T lineage histology, CNS positivity at diagnosis, time period of diagnosis, not isolated CNS or testicular relapse, and relapse before 36 months. Two factors were not considered in the multivariable model: DNA index was not included because data were available on too few patients, and risk group was collinear with initial age and WBC. Table 4 illustrates that in multivariable analysis, independent poor prognostic variables were age  $\geq 10$  years at diagnosis, initial WBC  $\geq 50 \times 10^9/L$ , initial CNS positivity, relapse before 36 months, and not isolated CNS or testicular relapse. Time period of therapy and T cell immunophenotype were no longer significant in the model.

In order to define a good risk group, we used site of relapse and time to relapse because they had the most extreme hazard ratios with regard to EFS and OS. We did not incorporate additional factors such as initial diagnostic features because they added only marginally to the ability to distinguish between groups, and would have limited the favorable-risk group to a very small number of patients. Using the 2 features at the time of relapse, the favorable risk group consisted of 41 (5.4% of the initial cohort) children who experienced relapse in either a testicular or CNS site, at least 36 months from diagnosis. For this group, the 3-year postrelapse EFS was  $50.0\% \pm 8.9\%$  and OS was  $68.0\% \pm 8.1\%$ .

**Figure 1.** Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) are shown for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in Central America



**Table 2.** Outcomes Following First Relapse in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia in Central America (N ¼ 755)

Outcome	Value
Event-free survival at 3 y ± SE	22.0 1.7
Overall survival at 3 y ± SE	28.3 ± 1.9
Subsequent event following first relapse n (%)	
Abandonment	46 (6.1)
Refusal of treatment	4 (0.5)
Relapse	139 (18.4)
Death	370 (49.0)
None	196 (26.0)
Median years to next event (IQR)	
Abandonment	0.22 (0.09-0.52)

Refusal of treatment	0.45 (0.29-0.57)
Relapse	0.87 (0.45-1.96)
Death	0.19 (0.08-0.44)
None	1.90 (0.58-4.87)
Cause of death n (%) N = 492	
Infection	96 (19.5)
Hemorrhage	34 (6.9)
Progressive disease	346 (70.3)
Other	16 (3.3)

Abbreviations: IQR, interquartile range n, number experiencing the event; N, total number at risk and only displayed when missing data; SE, standard error.

## Discussion

We found that children with relapsed ALL in Central America had poor outcomes overall, although some children appear to have prolonged survival. For those who experience a second relapse, some may live relapse-free for several months to several years. We determined predictors of survival and identified a good risk group with EFS of 50% and OS of 68%. These findings can be used to guide therapeutic decision-making following relapse for children with ALL in Central America.

For children with relapsed ALL in Central America, EFS and OS are inferior to those described in recent reports from HIC.<sup>2-8</sup> There are multiple reasons for this inferior survival. First, ALL outcomes are generally inferior in LMIC, and this survival gap is typically attributed to higher treatment-related mortality and abandonment of therapy.<sup>15</sup> In addition, salvage treatments are limited in LMIC. In particular, access to newer expensive drugs may be difficult or impossible, and hematopoietic stem cell transplantation is not available in the region. Finally, given the costs and burden associated with treatment of relapsed ALL, parents and health care professionals may choose a palliative approach earlier in a resource-limited context.

**Table 3.** *Univariate Analysis of Event-Free and Overall Survival for Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia in Central America*

Event-Free Survival				Overall Survival		
Characteristic	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Characteristics at Diagnosis						
Age >10 y	1.57	1.32-1.88	<.0001	1.61	1.33-1.95	<.0001
Sex, male	0.96	0.81-1.13	0.598	0.94	0.79-1.13	0.532
Race						
Hispanic	0.94	0.78-1.13	0.517	1.04	0.85-1.26	0.712
Indigenous	1.2	0.90-1.60	0.216	1.3	0.97-1.76	0.083
Caucasian or mixed race	REF			REF		
Missing	1.87	0.83-4.20	0.131	1.46	0.54-3.93	0.452
Initial WBC						
<50 x 109/L	REF			REF		
≥ 50 x 109/L	1.59	1.31-1.93	<.0001	1.49	1.20-1.84	0.0003
Missing	0.92	0.71-1.19	0.529	0.92	0.70-1.21	0.545
DNA index						
≥ 1.16	REF			REF		
<1.16	1.92	1.38-2.66	0.0001	1.89	1.34-2.65	0.0003
Missing	1.66	1.19-2.32	0.003	1.55	1.10-2.21	0.014
Histology						
B lineage	REF			REF		
T lineage	1.46	1.12-1.90	0.005	1.53	1.16-2.02	0.003
Missing	1.16	0.82-1.63	0.403	1.09	0.75-1.58	0.649
Central nervous system status						
Negative (CNS 1 or CNS 2)	REF			REF		
Positive (CNS 3)	1.6	1.14-2.26	0.007	1.59	1.08-2.33	0.018
Missing	0.69	0.52-0.92	0.011	0.69	0.51-0.94	0.018
Risk category						
Standard risk	REF			REF		
Intermediate risk	1.73	1.19-2.51	0.004	2.06	1.40-3.02	0.0002
High risk/very high risk	1.69	1.39-2.05	<.0001	1.74	1.41-2.14	<.0001
Missing	1.19	0.84-1.69	0.336	1.23	0.85-1.80	0.271



Diagnosis time period						
1990-1999	REF			REF		
2000-2007	1.27	1.01-1.60	0.044	1.44	1.12-1.86	0.005
2008-2011	1.65	1.22-2.23	0.001	1.92	1.38-2.67	<.0001
Characteristics at Relapse						
Time to relapse <36 mo	2.22	1.79-2.74	<.0001	2.39	1.90-3.01	<.0001
Site of first relapse						
Isolated CNS or testes	REF			REF		
Not isolated CNS or testes	1.61	1.32-1.96	<.0001	1.89	1.51-2.37	<.0001
Phase of therapy at relapse						
Consolidation/intensification	0.88	0.67-1.16	0.369	0.87	0.65-1.18	0.374
Maintenance	REF			REF		
Follow-up	0.4	0.32-0.51	<.0001	0.38	0.30-0.48	<.0001
Abandoned	0.66	0.52-0.84	0.0007	0.63	0.49-0.82	0.0004
Not abandoned prior to relapse	1.13	0.90-1.43	0.302	1.15	0.90-1.47	0.263

Abbreviations: CI, confidence interval; CNS, central nervous system; HR, hazard ratio; REF, reference value; WBC, white blood cell count.

We found that some children had prolonged survival, and even for those who did relapse a second time, most of those relapses occurred between 6 and 24 months; this relapse-free time may be important to families. Thus, our findings suggest that aggressive treatment may be beneficial for at least some Central American children with ALL relapse, particularly for those who have favorable prognostic features. However, there are important factors to consider when deciding to treat a child with relapsed ALL, including preferences and the socioeconomic context of the family.

The strengths of this study include the large sample size, which permitted robust modeling of predictors of postrelapse survival, and that all the centers included (with their satellites) provide the majority of the pediatric oncology care in their respective countries. This approach allowed highly generalizable, population-level analysis of all children experiencing relapse.

Event-Free Survival				Overall Survival		
Characteristic	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Characteristics at Diagnosis						
Age at diagnosis >10 y	1.42	1.18-1.71	0.0002	1.45	1.20-1.77	0.0002
WBC at diagnosis						
<50 _ 109/L	REF			REF		
≥ 50 _ 109/L	1.47	1.20-1.81	0.0002	1.35	1.08-1.69	0.008
Missing	0.008	0.76-1.46	0.773	1.17	0.82-1.65	0.389
Histology at diagnosis						
B lineage	REF			REF		
T lineage	1.05	0.79-1.39	0.75	1.16	0.86-1.56	0.327
Missing	1.46	1.01-2.12	0.047	1.39	0.93-2.09	0.108
CNS status at diagnosis						
Negative (CNS 1 or CNS 2)	REF			REF		
Positive (CNS 3)	1.52	1.07-2.16	0.021	1.53	1.03-2.25	0.034
Missing	0.68	0.47-0.98	0.039	0.74	0.50-1.10	0.138
Diagnosis time period						
1990-1999	REF			REF		
2000-2007	0.94	0.70-1.27	0.538	1.16	0.83-1.61	0.381
2008-2011	0.89	0.62-1.29	0.679	1.12	0.75-1.68	0.573
Time to relapse < 36 mo	2.19	1.76-2.74	<.0001	2.35	1.85-3.00	<.0001
Site of first relapse						
Isolated CNS or testes	REF			REF		
Not isolated CNS or testes	1.79	1.46-2.19	<.0001	2.1	1.67-2.63	<.0001

Abbreviations: CI, confidence interval; CNS, central nervous system; HR, hazard ratio; REF, reference value; WBC, white blood cell count.

However, our study must be interpreted in light of its limitations. First, we observed that all children who abandoned treatment after relapse died. If some children with ALL abandoned primary therapy, relapsed, and never returned to the health care system, these children would have been excluded from our study. Thus, this exclusion may have biased our results. Although the magnitude of this problem is unknown, prior data may be helpful. In a previous study from El

Salvador, we found that 19 of 443 (4.3%) of children with ALL abandoned therapy and did not return for care.<sup>9</sup> These data provide an estimation of the number of children with relapsed ALL who may have been excluded from the analysis. Second, our study only included relapsed patients; therefore, we do not have an estimation of relapse rates and how these may have changed over the study time period. An additional limitation is that relapse therapy varied without a coordinated relapse protocol and thus, we could not evaluate the role of therapy on relapse outcomes. Therapy is one of the most important prognostic factors in relapsed ALL, and introduction of a common relapse protocol for the region is an important future goal. Finally, we do not have an accurate measure of the proportion of patients treated with a curative intent who achieved a second remission; such data would provide important prognostic information for specific patient subgroups.

In conclusion, we found that outcomes for relapsed ALL in Central America are poor. However, some children have prolonged survival, and even among those who relapse again, they may live relapse-free for many months. Consequently, aggressive treatment may be warranted for at least some children with relapsed ALL, particularly in those with better prognostic features. Future studies should evaluate treatments received and quality of life in order to gain more insight into optimal treatments in the relapsed ALL setting in the LMIC context. Use of common relapse protocols would facilitate better understanding of relapsed ALL outcomes.

### **Funding sources**

The Pediatric Oncology Group of Ontario funded the data management program through which the data were initially collected.

### **Conflict of interest disclosure**

Dr. Sung is supported by a New Investigator Award from the Canadian Institute of Health Research.

## References

1. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol.* 2011;29:551-565.
2. Freyer DR, Devidas M, La M, et al. Postrelapse survival in childhood acute lymphoblastic leukemia is independent of initial treatment intensity: a report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 2011;117:3010-3015.
3. Ko RH, Ji L, Barnette P, et al. Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study. *J Clin Oncol.* 2010;28:648-654.
4. Malempati S, Gaynon PS, Sather H, La MK, Stork LC; Children's Oncology Group. Outcome after relapse among children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study CCG-1952. *J Clin Oncol.* 2007;25:5800-5807.
5. Mitsui T, Mori T, Fujita N, Inada H, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Retrospective analysis of relapsed or primary refractory childhood lymphoblastic lymphoma in Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52:591-595.
6. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, et al; Children's Oncology Group. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia.* 2008;22:2142-2150.
7. Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol.* 2010;28:2339-2347.

8. von Stackelberg A, Vo"lzke E, Ku"hl JS, et al; ALL-REZ BFM Study Group. Outcome of children and adolescents with relapsed acute lymphoblastic leukaemia and non-response to salvage protocol therapy: a retrospective analysis of the ALL-REZ BFM Study Group. *Eur J Cancer*. 2011;47:90-97.
9. Bonilla M, Gupta S, Vasquez R, et al. Predictors of outcome and methodological issues in children with acute lymphoblastic leukaemia in El Salvador. *Eur J Cancer*. 2010;46:3280-3286.
10. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al; Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004;104:2690-2696.
11. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009;360:2730-2741.
12. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia*. 2008;22:989-997.
13. Quintana Y, Patel AN, Naidu PE, Howard SC, Antillon FA, Ribeiro RC. POND4Kids: a web-based pediatric cancer database for hospital-based cancer registration and clinical collaboration. *Stud Health Technol Inform*. 2011;164:227-231.
14. Ayoub L, Fu' L, Pen~a A, et al. Implementation of a data management program in a pediatric cancer unit in a low income country. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49:23-27.
15. Gupta S, Antillon FA, Bonilla M, et al. Treatment-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in Central America. *Cancer*. 2011;117:4788-4795.

## Review

# Pediatric Oncology Research in Low Income Countries: Ethical Concepts and Challenges

©2011 Wiley Periodicals, Inc. DOI 10.1002/pbc.23419. Published online 6 December 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Avram E. Denburg, MD, Msc<sup>1</sup>; Steven Joffe, MD, MPH<sup>2</sup>; Sumit Gupta, MD<sup>1, 3</sup>; Scott C. Howard, MD, MS<sup>4</sup>; Raul C. Ribeiro, MD<sup>4</sup>;

Federico A. Antillon, MD, PhD<sup>5</sup>; Roberto Vasquez, MD<sup>6</sup>; and

Lillian Sung, MD, PhD<sup>1, 3</sup>; e-mail: lillian.sung@sickkids.ca

<sup>1</sup>Division of Haematology/Oncology, Department of Pediatric Oncology; The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; <sup>2</sup>Dana-Farber Cancer Institute and Department of Medicine, Boston; Massachusetts; <sup>3</sup>Child Health Evaluative Sciences, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; <sup>4</sup>Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; <sup>5</sup>Unidad Nacional de Oncología Pediátrica, Guatemala City, Guatemala; <sup>6</sup>Pediatric Oncology, Benjamin Bloom National Children's Hospital, San Salvador, El Salvador.

Uneven strides in research and care have led to discrepancies in childhood cancer outcomes between high and low income countries (LICs). Collaborative research may help improve outcomes in LICs by generating knowledge for local scientific communities, augmenting knowledge translation, and fostering context-specific evaluation of treatment protocols. However, the risks of such research have received little attention. This paper investigates the relationship between pediatric oncology research in LICs and four core issues in the ethics literature: standard of care, trial benefits, ethics review, and informed consent. Our aims are to highlight the importance of this field and the need for further inquiry. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58:492–497.

**Key words:** ethics review; informed consent; low income countries; pediatric oncology; research ethics; standard of care; trial benefits.

## Introduction

Children with cancer in high income countries (HICs) have benefited from substantial advances over the past several decades, and now enjoy average cure rates above 80% [1]. Survival rates in low income countries (LICs), however, are 5–60% [2]. Of the approximately 250,000 children who develop cancer annually, only 50,000 live in HICs [3]. Over the last two decades, pediatric oncologists in both HICs and LICs have begun to address this survival gap through “twinning partnerships,” in which HIC and LIC institutions collaborate to improve outcomes for children with cancer [4–7]. Twinning programs have made possible improvements in infrastructure, enhanced access to drugs and diagnostic tests, consultation with HIC experts, and training of local health care providers [8–11].

As such initiatives have improved outcomes in LICs, interest has emerged in conducting research. Pediatric oncology research in LICs has the potential to improve outcomes for LIC children with cancer by generating knowledge for both local and global scientific communities, augmenting resource- and knowledge transfer activities, and fostering context-specific evaluation of prognostic variables and treatment protocols. However, the concomitant risks of such research have received little attention. The potential for exploitation of patients, families, already overworked clinical staff, and the community as a whole is not insignificant. This risk is greatest when researchers gear LIC trials to answer questions of principal relevance to HICs, with minimal possibility for LIC benefit. Primarily, these risks attach to interventional studies, with drug development trials posing unique risks in the LIC setting. Various other types of research, including chart reviews and simple observational studies, carry less ethical risk. Nonetheless, as in HIC settings, these too require ethical oversight. Given the resource limitations in most LICs, the maintenance of standards to protect research participants likewise remains problematic. Clearly, as pediatric oncology research in LICs expands, exploration of the relevant ethical issues becomes essential.

Moreover, a number of factors give rise to unique ethical issues in pediatric oncology research in LICs. The use of complex, toxic therapies demands nuanced, iterative appraisals of risks and benefits, with resultant implications for study design and implementation. Likewise, the dependence on coordinated, multi-disciplinary care for the survival gains witnessed in HICs implicates the health system as a rate-limiting step for improving outcomes. This underlines the need to evaluate the feasibility and appropriateness of research within variable LIC system contexts, as any perturbation in the system may reduce its ability to deliver care. Lastly, the proven benefits of collaborative approaches in pediatric oncology research in HICs prompt consideration of similar paradigms in LICs, including their attendant ethical issues.

This paper will assess the interplay between pediatric oncology research in LICs and four core issues in the ethics literature: standard of care, trial benefits, ethics review, and informed consent (Table I). We seek to highlight the importance of this field and the need for further inquiry, and to enliven debate on these issues among those involved in pediatric oncology in all settings.

## **Methods**

Literature reviews on ethical issues related to standard of care, trial benefits, ethics review, and informed consent were conducted through electronic searches of major science and social sciences databases (ISI Web of Knowledge, WorldCat, Social Sciences Abstracts, Medline and PubMed), which were supplemented by hand searches of relevant journals and ongoing “snowball” searches from reference lists. We focus on the ethical implications of drug development and intervention research, as distinct from quality improvement projects in pediatric oncology care in LICs. In categorizing countries, we use World Bank definitions of high, middle, and low income countries, with economies divided according to 2008 gross national income per capita (low income, \$975 or less; lower middle income, \$976–\$3,855; upper middle income, \$3,856–\$11,905; and high income, \$11,906 or more) [12].



**Table 1.** *Ethical Dimensions of Drug Development Research in LIC Paediatric Oncology*

Issue	Themes	Sample questions
Standard of care	Scientific necessity Host community relevance Non-maleficence Host community benefits	What principle(s) should govern determination of the control arm of a paediatric ALL therapeutic trial in LICs?+ What are the social and health system ramifications of the proposed study? What protections should research sponsors and investigators offer to LIC communities in which clinical trials are conducted?
Trial benefits	Reasonable availability Fair benefits	Is provision of post-trial access to the study intervention, if proved safe and effective, mandatory in LICs? Who bears this responsibility? Should researchers employ a different principle to determine the extent and nature of benefits? To what extent should the social context determine the degree or character of trial benefits?
Ethics review	Community engagement Local IRB capacity	What responsibility do international research sponsors/investigators have to create and sustain local IRB capacity? What principles or mechanisms should IRBs use to help research sponsors and communities explore differences in values or perspectives?
Informed consent	Literacy, cultural perceptions of care Agency relationship/ power imbalances Children and proxy decision making	How do researchers and community institutions ensure lack of coercion in trial enrolment? Are any special protections necessary in LICs to ensure protection of the best interests of children enrolled in therapeutic oncology protocols?

## Results

### Standard of Care–Universalism Versus Relativism

The concept of a “standard of care” has figured prominently in recent debates on international research ethics [13–17]. Defining the “standard of care” is important when deciding which treatment patients assigned to the control arm of a comparative trial will receive; a broader understanding also encompasses disease evaluation, follow-up, and supportive care. Whether or not research trials institute the same standards of care for subjects in LIC settings as they would

for those in HICs is a charged issue with considerable implications for the conduct of pediatric oncology clinical trials in LICs.

The importance of standards of care in medical research is intimately related to the protection of research subjects. Protection, in turn, hinges primarily on the prevention of exploitation. Wertheimer construes exploitation as contingent on the balance between risks ventured and benefits received by each party in a given interaction [18]. Moral discomfort arises from an imbalance in this tally of risks and benefits.

Efforts to guard against exploitation have fostered principles regarding minimum standards of care necessary for the ethical conduct of trials. A prevalent opinion—captured in key pieces of national legislation and international declarations—accords universality to medical standards in research. The US National Bioethics Advisory Commission maintains that “clinical trials (should) provide members of any control group with an established effective treatment, whether or not such treatment is available in the host country” [19]. It defines established as “widespread acceptance by the global medical profession” and effective as “successful as any in treating the disease or condition” [17]. This perspective holds remarkable sway and has fuelled controversy in international collaborative research [14,20–22]. Revised in 2008 in response to ongoing debate on this issue, the World Medical Association’s Declaration of Helsinki qualifies the concept of a “universal” standard of care:

The benefits, risks, burdens and effectiveness of a new intervention must be tested against those of the best current proven intervention, except in the following circumstances: The use of placebo, or no treatment, is acceptable in studies where no current proven intervention exists; or, where for compelling and scientifically sound methodological reasons the use of placebo is necessary to determine the efficacy or safety of an intervention and the patients who receive placebo or no treatment will not be subject to any risk of serious or irreversible harm. Extreme case must be taken to avoid abuse of this option [23].

The Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) reaffirms this stance [24]. Growing calls among ethicists, researchers, sponsors, and policymakers for attention to context in standards of care have swung the moral pendulum away from strict universalism toward a conditional relativism in standards for international trials [25–28]. For instance, the UK Nuffield Council for Bioethics explicitly permits modified standards of care for research in LIC settings: “Wherever appropriate, participants in the control group should be offered a universal standard of care for the disease being studied. Where it is inappropriate to offer such a standard, the minimum that should be offered is the best intervention currently available as part of the national public health system” [29]. The intended goal of relative standards is to minimize exploitation and conduct research of specific value to LIC populations, without shading into outright moral relativism. To this end, Wendler et al. [17] propose that research evaluating less-than-the-best interventions should be allowed only when the following criteria are met: (i) scientific necessity, (ii) host community relevance, (iii) subject and host community non-maleficence, and (iv) sufficient host community benefits.

Scientific necessity implies that an important clinical question can only be answered through use of the proposed control arm. The relevance of this principle to pediatric oncology research is apparent. Consider an LIC institution that has adopted a reduced-intensity treatment protocol for acute lymphoblastic leukemia (ALL), and plans to conduct a randomized trial to determine whether the addition of another agent, such as PEGL-asparaginase, is beneficial. Strict universalism would dictate that the standard arm constitutes an established effective treatment—namely, a regimen deemed optimal ALL therapy in HICs. By contrast, conditional relativism in standards of care allows for a standard arm predicated on the host country’s existing treatment protocol—an approach that is not only feasible but provides information of specific value to the population studied. There are, of course, potential problems that attach to such an ethical paradigm, including the perception of double standards and the risk of a persistent gulf in clinical outcomes between HIC

and LIC populations. Clearly, the benefits and risks of relativity in standards of care for pediatric oncology drug trials in LICs need further exploration.

Host community relevance speaks to research that generates findings of clinical value to the local population. In the example above, the control arm most relevant for the host community would be the treatment protocol currently in use, assuming that evidence and experience suggest acceptable toxicity. Conversely, control arms that are impractical in a given LIC setting may lack local relevance and, by extension, ethical credibility. Emanuel et al. [30] have argued that research requires social value to be ethical. A US pharmaceutical company's proposed trial of a novel surfactant preparation against both US-approved surfactant and placebo in Latin American neonatal intensive care units was controversial for this reason [16]. It proposed to evaluate an intervention that was unaffordable in the local settings, against a control that was either unavailable (existing surfactant) or arguably unethical (placebo). The benefits of this trial were directed primarily at HIC populations and were largely irrelevant to local populations. Analogous examples in pediatric oncology are not hard to imagine. The testing of novel and expensive therapeutics (new agent chemotherapies, monoclonal antibodies) are likely not justifiable in populations for whom these interventions would be out of reach before and after the study period.

Non-maleficence in this context requires that research not harm the existing system, nor compromise either the standard of, or access to, current care. Put simply, the trial should not leave the subjects or host community worse off than they would be if the trial were never conducted. Seriously ill children must receive care that is as good as, or potentially better than, existing treatments available to them outside the trial. The research protocol, including its associated infrastructure and trial supports, should maintain or build system capacities rather than drain them. This is a particular risk in LIC settings where individual clinicians and overall health systems confront tremendous workloads. The implementation of a randomized trial in pediatric ALL therefore risks reducing both time for clinical

care and supplies for other patients. Any such trial should therefore hire and train health care personnel, augment laboratory and diagnostic capacity, and improve supportive care for children on therapy to ensure that non-study children do not receive reduced resources or care as a result of the trial's existence.

## **Trial Benefits**

The issue of trial benefits dovetails closely with the “standard of care” debate. Predicating exploitation in research on unfavorable risk-benefit ratios to participants suggests that augmenting benefits works to mitigate potential risks [31–33]. The extent of benefits extended to research subjects and their communities, and the locus of responsibility to ensure their provision, remain pivotal issues. It is now broadly acknowledged that research in LICs prompts a different appraisal of risk, based on a greater potential for exploitation. This compels a distinct and more extensive catalogue of benefits [32,34,35].

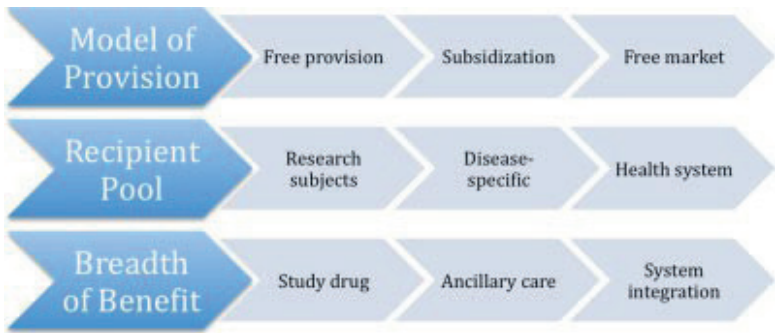
International statements on research ethics, including the Declaration of Helsinki and the CIOMS International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects, demonstrate basic consensus on the issue of trial benefits. Three points are relevant: pre-trial negotiations, intra-trial conduct, and post-trial provisions. Prior to trial initiation, investigators must delineate research conditions and benefits with the host community. At its close, a duty to assure sustained access to effective interventions is assigned. Throughout and beyond, efforts to build local capacity such that host country researchers and institutions can become full partners in the research are required [36]. However, the details of these duties are rarely spelled out and differ across guidelines. Much of the debate revolves around the idea of “reasonably available” benefits. The CIOMS guidelines dictate: “the sponsor and the investigator must make every effort to ensure that any intervention or product developed, or knowledge generated, will be made reasonably available for the benefit of that population” [24]. The Declaration of Helsinki refers to “a reasonable likelihood that (the) population or community stands to benefit from the results of the research” [23].

The vague nature of the duty to ensure that the benefits of the research be made reasonably available leads to debate on several fronts (Fig. 1). First, the nature and strength of sponsors' responsibility to assure post-trial benefits at the outset is questioned. Does responsibility fall squarely on research sponsors and investigators, or is it a shared obligation of all partners, including the host country or institutions? The means of making interventions "reasonably available" are likewise debated. Are free provision, subsidization, and free market pricing of study drugs equally legitimate ways of discharging this duty? Many research endeavors in the LIC setting are poorly funded and funding is typically limited to the study period. Consequently, continued provision of interventions after study closure may prove difficult, depending on the funding model adopted. Finally, the scope of the recipient pool is unclear. Does this benefit accrue to research subjects alone, or should it include their larger communities?

The study of locally adapted pediatric ALL treatment illustrates these uncertainties. An incremental approach to progress in ALL therapy in LICs implies iterative gains in standards of care. For instance, the successful addition of high-dose methotrexate to ALL protocols in resource-constrained settings depends not only on the cost of the drug but also the system's ability to administer, monitor, and troubleshoot its use. Must investigators, research institutions or local governments continue to fund access to methotrexate at the trial's close? If so, who within the country should have access to it? What about the capacity to provide the supportive care that is needed to safely deliver it? Who bears the longterm fiscal and operational costs for enhanced nursing and laboratory capacity? The responsibility to entrench and extend modalities of supportive care offered on-study—be they medical, such as treatment of chemotherapeutic side effects and opportunistic infection, or social, such as transportation and housing subsidies— to those off-study is far from clear. Most broadly, if study results identify a new standard of care, who is accountable for ensuring that it is made available to the relevant communities?

Despite its acceptance by many guidelines, the concept of “reasonable availability” is controversial. Some regard it as a blunt tool for gauging individual and community benefits, insofar as ongoing access to a trial intervention does not preclude exploitative terms of conduct [37]. In a context of resource scarcity, the strength of the inducement to enroll in research as a means to access the trial intervention may in fact cloud appraisal of a study’s risks. It is not hard to imagine a scenario wherein issues of consent, privacy, and risk command less attention than the apparent promise of a study drug, particularly in the context of fatal untreated disease. These issues warrant careful dissection amidst mounting efforts to conduct therapeutic trials in pediatric oncology in LICs.

**Figure 1.** *Continuum of duty to ensure “reasonable availability” of benefits*



**Ethics Review**

Formal ethics review board (ERB) oversight is fundamental to the safety and legitimacy of human research. Although routine in most HICs, ERBs are rare in many LICs. Notable efforts have been made to establish ERBs in select LIC contexts [38,39]. Their continued development is crucial to expanded and ethically sound research. However, international collaboration for research oversight is itself fraught with a number of tensions.

Core functions of ERBs include: analysis of the risks and benefits of research to protect subjects and promote equity in the distribution of benefits and burdens; education of researchers; and the audit of ongoing research for public accountability [34]. Although the first of these functions is increasing in LICs, implementation of the latter two remains haphazard. Consequently, both the profession and the public face uncertainty regarding rights and responsibilities in research settings. This has meant more room for exploitation of subjects, blurred lines of responsibility between medical providers, researchers and institutions, and a lack of public accountability for unethical protocols or practices [40].

Community engagement in research design and review—essential to synchronizing research goals, medical realities and community needs—is likewise patchy [41]. The instability of community structures, a dearth of representative institutions, and oversight or rarely willful neglect by investigators are all partially responsible [42,43]. In some countries, a lack of democratically legitimate political structures poses a further challenge. Creative mechanisms for securing robust and sustained channels of communication with local representatives, community leaders, and the interested public are therefore necessary for collaborative research efforts. Enhanced involvement of patient and family voices in the review process through existing or *de novo* representative bodies, such as local parents' associations, might help meet this need.

The responsibility to establish and maintain local ERB capacity also requires attention. CIOMS and UNESCO guidelines, among others, state that HIC sponsors must aid in the development of ethical oversight of research in LIC settings [24,44]. However, the implications are not well-fleshed out. Are sponsors ultimately responsible for decisions made by host country ERBs in the context of collaborative research? Is autonomy on the part of local ERBs established by foreign investigators realistic, given inherent power imbalances? A host ERB may well feel pressure from its institution to secure foreign research funds and reap the benefits of national and international prestige.



The need to oversee research across differences in culture, health systems, and local medical practices poses particular challenges for collaborative research oversight. Expertise with both the disease and acceptable variance in its treatment are therefore essential to ethical review of pediatric cancer research in LICs. So too is intimate familiarity with the realities of childhood cancer care in a specific LIC context, if local relevance and feasibility are to be met. Finally, sensitivity to the play of sociocultural factors on perceptions of cancer and its treatment is crucial to the ethical adjudication of research, especially when considering diseases for which treatment may cripple as well as cure.

Despite the challenges, international collaboration to establish and maintain ERB capacity for pediatric oncology research in LICs can work. Caniza et al. [38] report on the creation of a hospital-based ERB in El Salvador in the context of a twinning program that married the initiative and dedication of local researchers with the practical experience of HIC partners. Its success ultimately spawned El Salvador's first national ERB. However, the maintenance of ERB capacity in El Salvador has proved challenging, suggesting that this and like efforts require ongoing support and collaboration (Raul Ribeiro, personal communication). Nevertheless, the authors construe this as an instrumental component of the duty imposed on international sponsors by CIOMS and other guidelines to improve participant protection in LICs [38].

## **Informed Consent**

A cardinal principle in research ethics, informed consent operationalizes the respect merited by research subjects through formal recognition of their autonomy. A number of issues deserve focused attention in the context of pediatric oncology research in LICs. Some, such as the bind of illiteracy amid provisions for written consent, are more or less easily resolved. The Indian Council for Medical Research guidelines, for instance, contain provisions on admissible verbal consent, witnessed in writing by an unrelated party and potentially documented by audiovisual means, provided confidentiali-

ty is assured [45]. Others, however, have proven more intractable, as they trouble the definition and presuppositions of the concept itself.

The play of social and political power imbalances in global medical research is one such issue. Scarce health care resources, and the consequent incentive for local clinicians to enroll patients in well-funded international drug trials, complicate the process of obtaining truly informed and voluntary consent. Potential role conflicts created by discordant obligations of researcher and physician set this issue in relief. The power inherent in the agency relationship between doctor and patient is ripe for abuse where these identities overlap, particularly so in LICs, where access to care may be otherwise limited.

The ethical course is muddier still with respect to children, over whom another layer of authority is imposed. The issue of proxy decision-making and consent on behalf of children is thorny enough in HICs. The added complexity that stems from research on children in many LICs makes this a uniquely delicate problem. Pressure to enroll children in international drug trials to reap ancillary benefits may hinder informed parental decision making or eclipse consideration of the child's best interests. The inherent risks of this type of coercion are heightened in the context of cancer care, given the physical and psychosocial costs associated with treatment. Conversely, parents or communities unfamiliar with medical research or altogether suspicious of foreign investigators might withhold consent on behalf of their children, despite the latter's best interests, especially when treatment-related morbidity and mortality are so manifest. How to judge the best interests of a child, and who may legitimately do so, are difficult questions. Attempts to square local perspectives with international norms, such as those in the UN Convention on the Rights of the Child, add an additional layer of complexity to this debate. How to resolve the potentially competing needs and perspectives of child, parent, and community in such a setting remains a trying issue in international research, all the more so in respect of interventions as involved, burdensome, and sustained as oncology trials.

## Conclusion

Despite far-reaching scientific and clinical advances, vast global gaps in childhood cancer care remain. Research into the nature and extent of these discrepancies and the most effective means of mitigating their burden is essential, as is publication of the methods and results of these endeavors. The unique dimensions of this research demand recognition that the vulnerability of LIC populations to exploitation during drug development research is pronounced; the processes of institutional review and informed consent often weak or uncertain; and the degree of benefit to subjects and communities frequently unclear. The ethics of research into the care of children with cancer in LICs remains largely uncharted territory. Conceptual and empiric testing of questions related to standard of care, trial benefits, ethics review, and informed consent specific to pediatric oncology research efforts in LICs is an essential next step. Only by testing the center and limit of each of these questions against the specific reality of childhood cancer in LICs will we articulate a language up to the task.

**Conflict of interest and Financial disclosures:** SJ is a paid member of a data safety monitoring board for Genzyme Corporation.

## References

1. Ellison LF, Pogany L, Mery LS. Childhood and adolescent cancer survival: A period analysis of data from the Canadian Cancer Registry. *Eur J Cancer* 2007; 43:1967–1975.
2. Ribeiro RC, Steliarova-Foucher E, Magrath I, et al. Baseline status of paediatric oncology care in ten low-income or mid-income countries receiving My Child Matters support: A descriptive study. *Lancet Oncol* 2008; 9:721–729.
3. Kellie SJ, Howard SC. Global child health priorities: What role for paediatric oncologists? *Eur J Cancer* 2008; 44:2388–2396.
4. Antillon F, Baez FL, Barr R, et al. AMOR: A proposed cooperative effort to improve outcomes of childhood cancer in Central America. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45:107–110.
5. Harif M, Barsaoui S, Benchekroun S, et al. Treatment of B-cell lymphoma with LMB modified protocols in Africa—Report of the French-African Pediatric Oncology Group (GFAOP). *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50:1138–1142.
6. Howard SC, Marinoni M, Castillo L, et al. Improving outcomes for children with cancer in low-income countries in Latin America: A report on the recent meetings of the Monza International School of Pediatric Hematology/Oncology (MISPHO)-Part I. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:364–369.
7. Mostert S, Sitaresmi MN, Gundy CM, et al. Influence of socioeconomic status on childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in Indonesia. *Pediatrics* 2006; 118:e1600–e1606.
8. Farmer P, Frenk J, Knaul FM, et al. Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: A call to action. *Lancet* 2010; 376:1186–1193.

9. Howard SC, Pedrosa M, Lins M, et al. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. *JAMA* 2004; 291:2471–2475.
10. Ribeiro R, Pui CH. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in low- and middle-income countries: Challenges and opportunities. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:373–376.
11. Sloan FA, Gelband H, editors. Cancer control opportunities in low- and middle-income countries. Washington: The National Academies Press; 2007.
12. The World Bank. Data Catalog: Country Classifications. <<http://data.worldbank.org/about/countryclassifications>>. Accessed.
13. Angell M. The ethics of clinical research in the Third World. *N Engl J Med* 1997; 337:847–849.
14. Lurie P, Wolfe SM. Unethical trials of interventions to reduce perinatal transmission of the human immunodeficiency virus in developing countries. *N Engl J Med* 1997; 337:853–856.
15. Macklin R. After Helsinki: Unresolved issues in international research. *Kennedy Inst Ethics J* 2001; 11:17–36.
16. Shapiro HT, Meslin EM. Ethical issues in the design and conduct of clinical trials in developing countries. *N Engl J Med* 2001; 345:139–142.
17. Wendler D, Emanuel EJ, Lie RK. The standard of care debate: Can research in developing countries be both ethical and responsive to those countries' health needs? *Am J Public Health* 2004;94:923–928.
18. Wertheimer A. Exploitation. Princeton, NJ: Princeton University Press; 1999.

19. US NBAC. 2001. Ethical and Policy Issues in International Research: Clinical Trials in Developing Countries. In US National Bioethics Advisory Commission [Online] <<http://bioethics.georgetown.edu/nbac/pubs.html>>. Accessed.
20. Angell M. Investigators' responsibilities for human subjects in developing countries. *N Engl J Med* 2000; 342:967–969.
21. Brennan TA. Proposed revisions to the declaration of Helsinki—Will they weaken the ethical principles underlying human research? *N Engl J Med* 1999; 341:527–531.
22. Rothman KJ, Michels KB. The continuing unethical use of placebo controls. *N Engl J Med* 1994; 331: 394–398.
23. World Medical Association (WMA). 2008 [1964]. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. WHA [Online]. <<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>>. Accessed.
24. Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). 2002. International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects. In Geneva: CIOMS [Online] <[http://cioms.ch/frame\\_guidelines\\_nov\\_2002.htm](http://cioms.ch/frame_guidelines_nov_2002.htm)>. Accessed.
25. Benatar SR, Singer PA. A new look at international research ethics. *BMJ* 2000; 321:824–826.
26. Levine RJ. The “best proven therapeutic method” standard in clinical trials in technologically developing countries. *IRB* 1998; 20:5–9.
27. Resnik DB. The ethics of HIV research in developing nations. *Bioethics* 1998; 12:286–306.

28. Takala T. What is wrong with global bioethics? On the limitations of the four principles approach. *Camb Q Healthc Ethics* 2001; 10:72–77.
29. UK Nuffield Council on Bioethics. *The Ethics of Research Related to Healthcare in Developing Countries*. London, UK: Nuffield Council on Bioethics; 2002.
30. Emanuel EJ, Wendler D, Grady C. What makes clinical research ethical? *JAMA* 2000; 283:2701–2711.
31. Arras JD. Fair benefits in international medical research. *Hastings Cent Rep* 2004; 34:3–4.
32. Glantz LH, Annas GJ, Grodin MA, et al. Research in developing countries: Taking “benefit” seriously. *Hastings Cent Rep* 1998; 28:38–42.
33. Zong Z. Should post-trial provision of beneficial experimental interventions be mandatory in developing countries? *J Med Ethics* 2008; 34:188–192.
34. Benatar SR. Reflections and recommendations on research ethics in developing countries. *Soc Sci Med* 2002; 54:1131–1141.
35. Mari JJ, Lozano JM, Duley L. Erasing the global divide in health research. *BMJ* 1997; 314:390–391.
36. Lavery JV. Putting international research ethics guidelines to work for the benefit of developing countries. *Yale J Health Policy Law Ethics* 2004; 4:319–336.
37. Moral standards for research in developing countries: From “reasonable availability” to “fair benefits”. *Hastings Cent Rep* 2004; 34:17–27.

38. Caniza MA, Clara W, Maron G, et al. Establishment of ethical oversight of human research in El Salvador: Lessons learned. *Lancet Oncol* 2006; 7:1027–1033.
39. Moodley K, Myer L. Health Research Ethics Committees in South Africa 12 years into democracy. *BMC Med Ethics* 2007; 8:1–8.
40. Emanuel EJ, Steiner D. Institutional conflict of interest. *N Engl J Med* 1995; 332:262–267.
41. Weijer C, Emanuel EJ. Ethics. Protecting communities in biomedical research. *Science* 2000; 289:1142–1144.
42. Ford N, Mills EJ, Zachariah R, et al. Ethics of conducting research in conflict settings. *Confl Health* 2009; 3:7–28.
43. Schopper D, Upshur R, Matthys F, et al. Research ethics review in humanitarian contexts: The experience of the independent ethics review board of Medecins Sans Frontieres. *PLoS Med* 2009;6: e1000115.
44. UNESCO. 2005. Universal Declaration on Bioethics and Human Rights. In United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization [Online] <[http://portal.unesco.org/en/ev.php-URL\\_ID%31058&URL\\_DO%3DO\\_TOPIC&URL\\_SECTION%3D201.html](http://portal.unesco.org/en/ev.php-URL_ID%31058&URL_DO%3DO_TOPIC&URL_SECTION%3D201.html)>. Accessed.
45. Indian Council for Medical Research. Ethical Guidelines for Biomedical Research on Human Subjects. New Delhi: ICMR; 2006.



# Psychological Referral and Consultation for Adolescents and Young Adults With Cancer Treated at Pediatric Oncology Unit

© 2008 Wiley-Liss, Inc. DOI 10.1002/pbc.21484

Carlo Alfredo Clerici, MD

Maura Massimino, MD

Michela Casanova, MD

Graziella Cefalo, MD

Monica Terenziani, MD

Roberto Vasquez, MD

Cristina Meazza, MD

Andrea Ferrari, MD\*

\*Correspondence to: Andrea Ferrari, Pediatric Oncology Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Via G. Venezian, 1 20133 Milano MI, Italy. E-mail: [andrea.ferrari@istitutotumori.mi.it](mailto:andrea.ferrari@istitutotumori.mi.it)

## Abstract

**Purpose.** Managing older adolescents and young adults with cancer is a challenge, both medically and psychosocially: it is important to assess these patients' psychological issues and the type of services they need when deciding who should treat these patients, and where.

**Methods.** This study describes the pattern of psychological referral and consultation for older adolescents and young adults with cancer being treated at a pediatric oncology unit, as compared with the case of younger patients.

**Results.** Between 1999 and 2006, 318 patients <15 (32% of the patients in this age group) and 117 ≥15 years old (30%) were referred for psychological consultation. The number of interviews per patient was 2.8 for patients under fifteen and 7.8 for older patients. Younger patients were referred by all members of staff, while most older patients were referred by doctors, mainly because they had trouble adapting to the cancer's diagnosis and treatment. An ongoing, weekly, long-term psychotherapy was needed for 1% of patients <15 and 10% of those ≥15 years old.

**Conclusions.** Adolescents and young adults with cancer have specific psychological needs. While awaiting the full development of programs dedicated to these patients, they would seem to benefit from being treated in a multidisciplinary setting of the kind usually developed at pediatric units, fully integrating the psychological operators with the other staff members. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:105–109.

**Key words:** adolescents and young adults with cancer; liaison; psychological support; referral.

## Introduction

Malignant tumors are relatively rare in adolescents and young adults (AYA), but their management poses more of a challenge, in both the medical and the psychosocial spheres: these patients inhabit a “no-man's” land between pediatric oncology and “adult” medical oncology, and the problems of how and where AYA with cancer should be treated remain controversial [1–4].

The malignancies occurring in adolescence form a set peculiar to this particular age group, the majority being tumors typical of pediatric age (i.e., brain tumors, leukemia and lymphoma, sarcomas), and the remainder tumors of adulthood (i.e., melanoma, thyroid and other carcinomas) [1,5]. It makes a lot of sense to assume that these patients should be treated according to their type of tumor, not according to their age, that is, pediatric tumors should

be treated by pediatric oncologists, adult tumors by adult medical oncologists; however, this solution seems right for the tumor, but not for the patient [4]. AYA are complicated individuals with particular emotional, social and psychological problems, very diverse levels of maturity and different needs. It is essential to bear in mind that a diagnosis of cancer at this age has a major impact not only physically but also psychologically, and the related treatment has to cover the psychological issues [6,7]. In recent years, oncologists have been learning to pay more attention to their patients' psychological sphere and psychological support has come to be considered a fundamental service, especially in children's wards dealing with cancer [8]. Assessing a patient's psychological needs and the services available at different centers must be part of the process to choose who should treat adolescents with cancer, and where.

This study outlines the psychological support given to adolescents and young adults treated at the Pediatric Oncology Unit of the Istituto Nazionale Tumori of Milan, Italy, which is a pediatric oncology unit that forms part of a cancer institute, not of a pediatric department, where the pediatric oncologists can treat AYA patients with pediatric tumors whatever the patient's age. We describe the pattern of referral for psychological consultation and the type of any psychotherapy provided, comparing the approach used to deal with younger versus older patients.

## **Materials and methods**

At our department, psychological support for patients and their families is individually tailored on two different levels. The first level concerns the "medical psychological" approach: this involves the medical team (pediatric oncologists and nursing staff), social workers and teachers, and aims to provide initial emotional support for the anguish associated with the diagnosis of cancer and the prospect of therapies, while counseling can also be offered and any psychological needs identified. The second, clinical psychology level, where necessary, involves the clinical psychology specialists (who are

members of the staff and a daily presence at the clinic). Two specialists in clinical psychology are currently on the staff, one a medical doctor and the other a psychologist.

To identify any differences in the approach used for children and for AYA treated at our department between January 1999 and December 2006, we retrospectively analyzed and described the pattern of referral for psychological consultation, focusing on how and why patients were referred, and the nature of any psychotherapy. Patients were grouped by age, comparing the under 15 years old with those of 15 or more.

The main reasons prompting a psychological consultation were schematically classified as: (a) difficulty adapting to disease and treatment; (b) relational problems with the hospital team; (c) particularly stressful treatments, for example, high-dose chemotherapy or mutilating surgery; (d) problems of compliance with treatment; (e) emotional distress and adaptation problems in long-term survivors; (f) terminal disease; (g) relational difficulties in the family; (h) psychosocial problems; (i) psychopathological conditions in patients or their parents giving rise to subjectively experienced concerns or interfering with care-giving activities. Chisquared tests were used for statistical analysis. This study was approved by ethics panel of our Institution.

## **Results**

During the period considered, 1,386 patients with solid tumors were treated at our pediatric oncology unit: 991 were <15 and 395 (28%) were ≥15 years old. Of the latter group, 159 were older than 18 years (11% of the total). Overall, 435 patients received psychological support, amounting to a total of 1,810 interviews. Table I shows the percentages of younger and older patients requiring support, that is, 32% and 30%, respectively. The number of interviews per patient differed considerably, however, with 2.8 for the under 15 years old and 7.8 for the older patients.

**Table I.** *Psychological Support: Comparison Between Patients Under and Over 15 Years Old (1999–2006)*

Under 15 years old 15 and over		
Total patients	991	395
Patients given psychological support	318	117
%	32%	30%
Total number of interviews	897	913
Number of interviews/patient	2.8	7.8

**Figure 1.** *How patients were referred for consultation: comparison between patients under and over 15 years old.*

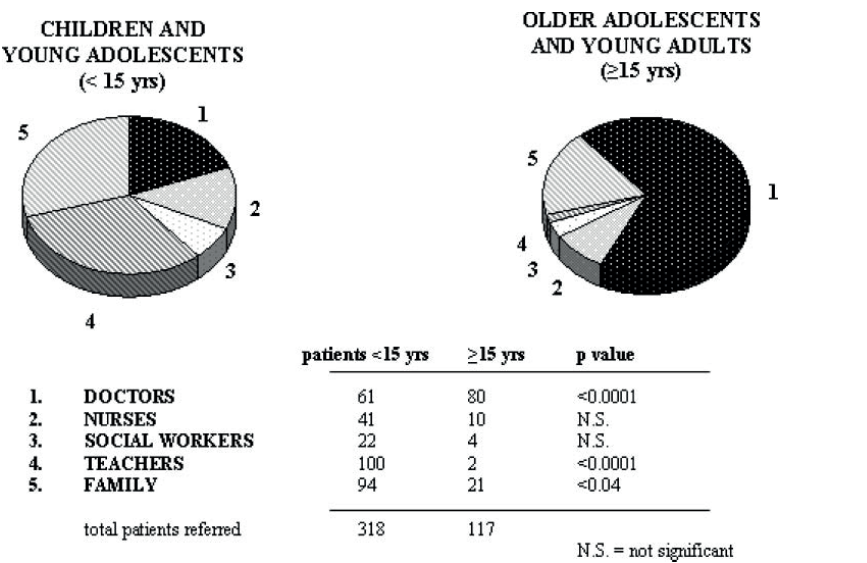
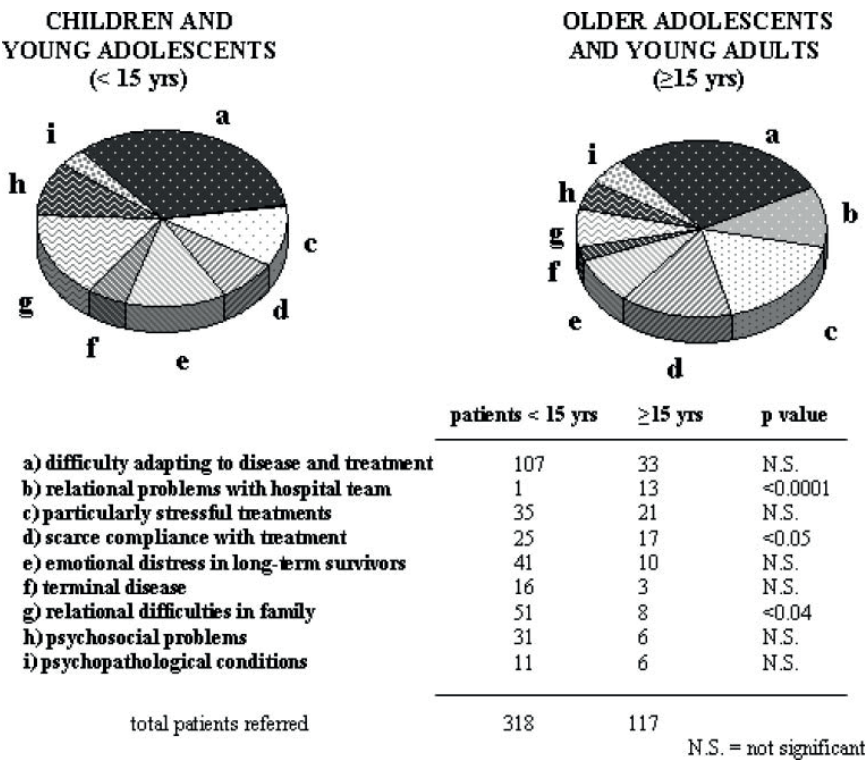


Figure 1 shows how patients were selected for clinical psychological consultation, comparing younger (318 patients <15 years) and older patients (117 patients ≥15 years): doctors referred 19% of younger and 68% of older cases, respectively ( $P<0.0001$ ), while teachers and playroom monitors referred 31% of children and 2% of adolescents ( $P<0.0001$ ); in 30% of younger cases the request for an interview came from parents or the patients themselves, as compared to 18% of older patients ( $P<0.04$ ).

The medical personnel were more involved in referring patients whose problems had to do with accepting the treatment, particularly treatments such as high-dose chemotherapy or mutilating surgery (doctors referred 66% of the patients with treatment acceptance problems), coping with terminal disease (63% of cases), and emotional distress in long-term cancer survivors who had completed their treatment (61%). The nursing staff tended more to report problems relating to poor compliance with treatment (nurses reported 47% of the cases of poor compliance). Social workers generally referred patients with relational difficulties within the family (25% of cases), while the teaching staff were much more active in identifying psychosocial distress (52% of the patients with psychosocial problems were referred by teachers) and difficulties in adapting to the disease and treatment (45% of cases).

Figure 2 shows the reasons why patients in the two age groups were referred for psychological consultation. In both groups, the main reason for referral concerned patients finding it difficult to adapt to the cancer diagnosis and related treatment (34% in the younger group and 28% in the older group). It is worth noting that quite a significant proportion (18%) of the younger patients had psychological consultation for relational difficulties within the family ( $P < 0.04$ ) (more between the parents than for the patient). These were the cases whose referral to the specialist was at the family's request. In the older group, a relevant number of patients had psychological support for problems of compliance with the treatment (15%) and relational difficulties with the hospital team (11%) ( $P < 0.0001$ ).

**Figure 2.** Reason for referral: comparison between patients under and over 15 years old



Particular differences emerged between the two age groups as regards the types of problem encountered in long-term survivors, after completing their treatment and during the follow-up. This type of emotional distress was often reported by the patients themselves and usually related to difficulties in adapting to their return to normal life after the trauma of their cancer and its treatment. Three particular situations were seen in AYA: problems relating to pregnancy (two cases), drug addiction (two cases) and attempted suicide (three cases).

As for the psychopathological conditions diagnosed and disregarding patients with organic mental disorders or retardation, that is, following cranial irradiation, the younger patients had reactive depression (11 cases), while the older patients (6 cases in all) also

had anorexia nervosa (2 cases) and obsessive-compulsive disorder (2 cases). Psychological support was provided in the form of weekly, long-term psychotherapy in only 3<15 years old (1%) and in 12 older patients (10%).

## **Discussion**

An adequate management of AYA with cancer demands a medical staff with specific skills, capable of recognizing and addressing all their various needs [7,9,10]. The ability to cope with the complex psychological world of the teenager is of fundamental importance, and it is increasingly recognized that conventional pediatric or adult healthcare units are not entirely suitable for such patients: the problem of where these patients should be treated, however, is still unsolved in most cases [1–4]. Pediatric oncology units may be naturally more appropriate, in clinical terms, for managing adolescents with pediatric malignancies [11,12], but these patients also seem to benefit from the multidisciplinary team typical of the pediatric oncology setting, where pediatric oncologiststeam up with surgeons and radiotherapists, but also with psychologistsand social workers.

Judging from our experience, the psychological supportgenerally provided by pediatric oncology units is suitable for AYA too, and may have an important added value for them. At our institution, psychological support is based on two completely different models in the pediatric and adult medical oncology settings. In the latter, the psychologist is outside the department and can be called in to visit a patient, give an opinion and recommend any clinical measures (consultation on request) [13–15]. Conversely, the Pediatric Oncology Unit has psychology specialists on the department's multidisciplinary staff, routinely present at the clinic (with two specialists for a unit serving 23 inpatients and 7 outpatients), based on the liaison model, which is characterized by close daily cooperation between the clinical psychologist and the other members of staff (oncologists, nurses, teachers, social workers), giving the specialist a chance to establish a genuine relationship with patients [13–15].



Our findings also show how important different members staff can be in pinpointing patients for psychological support, taking the essential first step towards recognizing and treating a problem: the referral process has technical (diagnostic), relational and organizational aspects (different procedures), as well as the emotional element. We found different referral patterns for different professional figures, for example, patients having difficulty in adapting to their disease and accepting the treatment were referred mainly by doctors; problems of poor compliance with therapies were mainly reported by nurses; cases with social and family difficulties were reported by social workers. Our main concern, however, was to identify differences relating to the patients' age, distinguishing children and young adolescents from older teenagers and young adults.

First of all, we found a similar percentage of patients in the two groups in need of psychological consultation, which came as something of a surprise, given the previously mentioned particular emotional aspects of adolescence. The marked difference between the two age groups lay, instead, in the number of interviews conducted per patient and the proportion of patients requiring longterm psychotherapy, which were clearly higher for older patients. For the younger patients, the specialist often needed to assess their psychological problem and the quality of their adaptation with a view to helping parents cope with the changes in their children's behavior. The specialist was often able to address the patient's needs with relatively few interviews. For the AYA, the specialist's main goal was to help the patients themselves to cope with their emotional and behavioral difficulties, and this was more likely to take prolonged consultation and a closer relationship between specialist and patient. In short, the older patients were not referred to the psychologist more often than the younger ones, but their problems were more complicated and difficult to deal with.

Another difference that emerged was that all members of staff referred younger patients for consultation, while most of the older patients were referred by doctors or the patients themselves asked for support. This is difficult to explain, but may be related to the

complexity of the emotional life of adolescents: on the one hand, they need a person to rely on, while on the other hand they may find relations with authority more difficult (in fact, a small percentage of the older patients were referred due to relational problems with the hospital team) [7,16].

AYA may experience particular psychological or psychopathological situations and the specialist working in a pediatric unit should be trained to recognize and address them: our series included patients revealing major adaptation difficulties after completing their treatment, patients who attempted suicide or became addicted to drugs, and patients with anorexia nervosa and obsessivecompulsive disorder [7,9,16,17].

These last considerations confirm the particular nature of the psychological problems of AYA. A clinical psychologist used to working with children may have some difficulties in attending to these particular needs, and the optimal solution is to train specialists specifically for this purpose. AYA deserve dedicated healthcare providers, specialized clinics and inpatient units, and dedicated research strategies [1–4]. Unfortunately, these needs are not often being satisfied. Our experience suggests that these patients benefit from being treated at a pediatric oncology unit rather than in an adult setting, and that future older adolescent and young adult oncology departments should adopt the model used at our and other pediatric oncology departments, fully integrating the psychological specialists among the other staff members.

## References

1. Bleyer A, Barr R. Highlights and challenges. In: Bleyer A, O'Leary M, Barr R, Ries LAG, editors. *Cancer epidemiology in older adolescents and young adults 15 to 29 years of age, including SEER incidence and survival: 1975–2000*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, NIH Pub. No. 06-576; 2006.
2. Bleyer A, Morgan S, Barr R. Proceedings of a workshop: Bridging the gap in care and addressing participation in clinical trials. *Cancer* 2006; 107:1656–1658.
3. Bleyer WA. Cancer in older adolescents and young adults: Epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38:1–10.
4. Ferrari A, Bleyer A. Participation of adolescents with cancer in clinical trials. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:603–608.
5. Albritton K, Bleyer WA. The management of cancer in the older adolescents. *Eur J Cancer* 2003; 39:2584–2599.
6. Lewis IJ, Fallon S, van Dongen-Melman J, et al. Cancer and the adolescent: The Second Teenage Cancer Trust International Conference, Royal College of Physicians, London, England, March 2001. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39:198–201.
7. Abrams AN, Hazen EP, Penson RT. Psychosocial issues in adolescents with cancer. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:622–630.
8. Spinetta JJ, Masera G, Eden T, et al. Refusal, non-compliance, and abandonment of treatment in children and adolescents with cancer. A report of the SIOP working committee on psychological issues in pediatric oncology. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39:114–117.

9. Hedstrom M, Kreuger A, Ljungman G, et al. Accuracy of assessment of distress, anxiety, and depression by physicians and nurses in adolescents recently diagnosed with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:773–779.
10. Evan EE, Kaufman M, Cook AB, et al. Sexual health and self-esteem in adolescents and young adults with cancer. *Cancer* 2006; 107:1672–1679.
11. Klein-Geltink J, Shaw AK, Morrison HI, et al. Use of paediatric versus adult oncology treatment centres by adolescents 15–19 years old: The Canadian Childhood Cancer Surveillance and Control Program. *Eur J Cancer* 2005;41:404–410.
12. Boissel N, Auclerc MF, Lheritier V, et al. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. *J Clin Oncol* 2003; 21:774–780.
13. Weisman AD, Hackett TP. Organization and functioning of a psychiatric consultation service. *Int Rec Med* 1960; 173:306–311.
14. Greenberg IM. Approaches to psychiatric consultation in a research hospital setting. *Arch Gen Psychiatry* 1960; 3:691–697.
15. Meyer E, Mendelson M. Psychiatric consultation with patients on medical and surgical wards: Patterns and processes. *Psychiatry* 1961; 24:197–220.
16. Palmer S, Mitchell A, Thompson K, et al. Unmet needs among adolescent cancer patients: A pilot study. *Palliat Support Care* 2007; 5:127–134.
17. Clerici CA, Ferrari A, Albasi C, et al. Five questions for assessing psychological problems in pediatric patients cured of neoplastic disease. *Pediatric Hematol Oncol* 2004;21: 481–487.

# Late Relapse of Embryonal Rhabdomyosarcoma, Botryoid Variant, of the Vagina

© 2008 Wiley-Liss, Inc. DOI 10.1002/pbc.21482

Roberto Vasquez, MD<sup>1</sup>

Paola Collini, MD<sup>2</sup>

Cristina Meazza, MD<sup>1</sup>

Francesca Favini, MD<sup>1</sup>

Michela Casanova, MD<sup>1</sup>

Andrea Ferrari, MD<sup>1</sup> \*

\* e-mail: [andrea.ferrari@istitutotumori.mi.it](mailto:andrea.ferrari@istitutotumori.mi.it)

<sup>1</sup>Department of Pediatric Oncology Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy.

<sup>2</sup>Department of Anatomic Pathology, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy

## Abstract

We report on two very similar cases of vaginal embryonal RMS, botryoid variant that relapsed 9 and 10 years after initial diagnosis, a few months after the menarche in both cases. A possible causal association with estrogen hormones is hypothesized, particularly for the second case described, in which estrogen receptors were negative in the primary tumor specimen and positive in the relapsing tumor specimen. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51:140–141.

**Key words:** chemotherapy; hormone receptors; menarche; rhabdomyosarcoma.

## Introduction

More than 70% of patients with localized rhabdomyosarcoma (RMS) are currently expected to be relapse-free 5 years after their initial diagnosis [1]. Most treatment failures occur in the first 3–5 years after the diagnosis of the primary, while later recurrences are uncommon [2–4]. This article reports on two very similar cases of embryonal RMS, botryoid variant, of the vagina in two children aged 24 and 10 months and relapsing 9 and 10 years, respectively, after the initial diagnosis. The relapse occurred a few months after the menarche in both cases, suggesting a possible relationship with sex hormone status.

## Case Report 1

A 24-month-old child was diagnosed with multifocal botryoid embryonal RMS of the vagina in November 1987. She was given chemotherapy (vincristine, adriamycin, cyclophosphamide and actinomycin-D) for 24 months, achieving a complete remission. No treatment for local control (surgery or radiotherapy) was administered. She had her menarche in June 1996 (at 11 years of age). Nine months later (112 months after the initial diagnosis), she presented to our Institute with transvaginal bleeding and evidence of a polypoid exophytic tumor on the vaginal introit. Further radiological investigation revealed a huge pelvic mass (9 cm x 7 cm in size). A biopsy was taken of the polypoid lesion and the histological diagnosis confirmed that it was a botryoid embryonal RMS. Immunocytochemical assessment of the estrogen and progesterone receptors was negative in the relapsed tumor cells.

The patient received second-line multi-drug chemotherapy (cisplatin/carboplatin, ifosfamide, etoposide, vincristine) with only minimal tumor shrinkage, followed by partial tumor resection and then radiotherapy (60 Gy). The tumor progressed locoregionally 10 months after the relapse had been identified, followed by hepatic, lung and brain metastases a month later. The patient died in May 1998.

## Case Report 2

A 10-month-old child was diagnosed with botryoid embryonal RMS in June 1994 after transvaginal biopsy of a bleeding vaginal polypoid lesion 3 cm x 2 cm in size. Chemotherapy with ifosfamide, vincristine, adriamycin, and actinomycin-D was administered for 12 months and the tumor disappeared completely. Two months after stopping the treatment, multifocal vaginal nodules were identified during a vaginotomy and another biopsy confirmed the recurrence. The patient was given second-line therapy with carboplatin, etoposide, vincristine and epirubicin, followed by brachytherapy (60 Gy), obtaining a second complete remission. In October 2005 the patient had her menarche (at 12 years of age). In November 2006, a vaginal polypoid lesion was detected. Multiple biopsies taken during a vaginotomy led to the diagnosis of a multifocal vaginal relapsing RMS. Immunocytochemical assessment of the estrogen and progesterone receptors disclosed reactivity for progesterone receptors in both the initial and the relapsing tumor specimens, while estrogen receptors were negative in the primary tumor and positive in the tumor relapsing after the menarche.

Re-staging investigations ruled out metastatic lesions, so five courses of chemotherapy with cyclophosphamide, actinomycin-D and vincristine were administered, then the patient underwent surgery consisting of vaginectomy and hysterectomy. Multiple tumor foci were found in the vaginal wall. A biopsy of a tiny lesion in the perineum, close to the urethra, also showed tumor cells outside the vagina, so external beam irradiation up to 50 Gy was given to the perineum and pelvis. Maintenance chemotherapy with vinorelbine was then administered. The patient was still on maintenance treatment at the time of this report, with no macroscopic evidence of disease.

## Discussion

Botryoid embryonal RMS of the vagina usually has a favorable prognosis (with a 10-year survival rate of 90%) [5]. This article describes two very similar cases of recurrent botryoid embryonal RMS of

the vagina sharing two particular features of potential interest, that is a very long interval before the recurrence, and a close association with the menarche, suggesting a close relationship with sex hormones.

Late relapses are known to occur in RMS, but they are by no means common. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) group reported a median time to treatment failure of 1.1 years, ranging from 1 week to 9 years, in the IRS-III, IV-pilot and IV protocols, with 95% of all recurrences occurring within 3 years of the first diagnosis [2]. The same group also analyzed events occurring in the 1,160 patients treated between 1984 and 1997, who were event-free 5 years after their RMS was diagnosed, and they estimated a 5-year and 10-year recurrence rate of 2.4% and 2.7%, respectively (22 late relapses) [3].

The Italian cooperative group reported a median time to recurrence of 17.8 months (range 1.7 months–12 years), and 95% of the relapses within 5 years of the initial diagnosis [4]. In our single-institutional experience of 475 RMS patients treated over a 30-year period, we recorded 232 relapses, occurring 1–144 months after the first diagnosis (median time to recurrence: 11 months), but—apart from the two patients described here—we had only one other relapse occurring more than 5 years after the initial diagnosis.

The two cases described here are peculiar not only for the very long time elapsing before their recurrence, but also because they shared the same particular clinical characteristics as concerns the histotype, the tumor site of origin and the possible association with sexual hormone status: both recurrences occurred a few months after the girls' menarche. This prompted us to explore hormone receptor expression by the tumor cells: while the immunocytochemical analysis of estrogen and progesterone receptors was negative in the first case, the second was positive for progesterone receptors in both initial and relapsing tumor specimens, with estrogen receptors testing negative in the primary tumor specimen and positive in the relapsing tumor specimen.

It is naturally hard to say whether the rise in estrogen level coinciding with puberty—combined with the presence of receptors on



the relapsing tumor—could have played a part in the tumor's recurrence. The peculiar features of these cases, and of the second one in particular, might point to a relationship between hormone status and tumor progression. As we know, the pathogenesis of RMS is still not clear and there are no well-established risk factors for this disease: genetic predisposition (i.e., Li-Fraumeni syndrome, neurofibromatosis type 1), ionizing radiation, chemical carcinogens and oncogenic viruses have rarely been associated with the onset of RMS [5–8]. A possible association between the progression of RMS and estrogen/progesterone stimulation has already been suggested in a case that has some features similar to our two cases: a young woman previously treated for parameningeal RMS relapsed 25 years later, 3 months after starting hormone replacement therapy with estrogen and progesterone; here again, the primary specimen was steroid receptor negative, while the recurrent tumor was positive [9].

In conclusion, our report describes two similar cases of botryoid embryonal RMS of the vagina relapsing several years after the first diagnosis and a few months after the patients' menarche. A causal association between these recurrences and estrogen hormones may be hypothesized. Reports of other similar cases are needed, of course, to confirm such a relationship, but our findings might suggest that a clinical and radiological follow-up longer than is usually recommended for other RMS cases might be indicated for patients with RMS of the vagina.

## References

1. Wexler LH, Meyer WH, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of pediatric oncology, 5th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. pp. 971–1001.
2. Pappo AS, Anderson JR, Crist WM, et al. Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:3487–3493.

3. Sung L, Anderson JR, Donaldson SS, et al. Late events occurring five years or more after successful therapy for childhood rhabdomyosarcoma: A report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Eur J Cancer* 2004; 40:1878–1885.
4. Mazzoleni S, Bisogno G, Garaventa A, et al. Outcomes and prognostic factors after recurrence in children and adolescents with nonmetastatic rhabdomyosarcoma. *Cancer* 2005; 104:183–190.
5. Leuschner I, Harms D, Mattke A, et al. Rhabdomyosarcoma of the urinary bladder and vagina. A clinicopathologic study with emphasis on recurrent disease: A report from the Kiel Pediatric Tumor Registry and the German CWS Study. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 856–864?
6. Diller L, Sexsmith E, Gottlieb A, et al. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* 1995; 95:1606–1611.
7. Gripp KW, Scott CI, Jr., Nicholson L, et al. Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: Proposal for a tumor screening protocol. *Am J Med Genet* 2002; 108:80–87.
8. Ferrari A, Bisogno G, Macaluso A, et al. Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Cancer* 2007; 109:1406–1412.
9. Zacharin M, Waters K, Chow CW, et al. Recurrent rhabdomyosarcoma after 25 years: A possible association with estrogens and progestogen therapy. *J Pediatr Haematol Oncol* 1997; 19:477–481.

## Capítulo 2. Patología pediátrica



# Multinational Retrospective Central Pathology Review of Neuroblastoma

## Lessons Learned to Establish a Regional Pathology Referral Center in Resource-Limited Settings

Teresa Santiago, MD; Ana C. Polanco, MD; Soad Fuentes-Alabi, MD; Caleb Hayes, MPH, MA; Elizabeth Orellana, MD; Belkis Gomero, MD; Mázlova Toledo González, MD; Eduvigis Ruiz, MD; Moisés Espino Durán, MD; Carlos Rodríguez-Galindo, MD; Monika Metzger, MD.

From the Departments of Pathology (Santiago, Hayes) and Global Pediatric Medicine (Rodríguez-Galindo, Metzger), St Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; the Departments of Pathology (Polanco) and Oncology (Fuentes-Alabi), Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, San Salvador, El Salvador; the Department of Pathology, Francisco Marroquín Medical School, Guatemala City, Guatemala (Orellana); the Department of Pathology, Hospital Infantil Dr Robert Reid Cabral, Santo Domingo, Dominican Republic (Gomero); the Department of Pathology, Hospital Escuela-Universitario, Tegucigalpa, Honduras (González); the Department of Pathology, Hospital Infantil Manuel de Jesus Rivera, Managua, Nicaragua (Ruiz); and the Department of Pathology, Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel, Panamá, Panama (Durán).

The authors have no relevant financial interest in the products or companies described in this article. Corresponding author: Teresa Santiago, MD, Department of Pathology, St Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, MS 250, Memphis, TN 38105-3678 (email: [Teresa.Santiago@stjude.org](mailto:Teresa.Santiago@stjude.org)).

Accepted for publication April 2, 2020.

Published online June 3, 2020.

**Context.**—Several countries of the Central America and Caribbean region have been sharing regional neuroblastoma (NB) treatment guidelines. However, there is no standardization in the diagnosis, subclassification, or tumor biology to aid in the risk stratification of these patients.

**Objective.**—To examine the histology and assess the accuracy of the local pathology reports; to evaluate the usefulness of manual MYCN immunohistochemistry (IHC); and to use NB as a model to identify the needs to establish a central pathology review (CPR) program in this region.

**Design.**—A retrospective CPR of specimens derived from patients with a diagnosis of NB and treated under the regional NB guidelines between 2012 and 2017 was conducted, allowing for a comparison between local diagnoses and the CPR diagnoses. Manual MYCN IHC was performed in the confirmed NB specimens and the results compared with known fluorescence in situ hybridization or automated IHC results, when available.

**Results.**—The 156 specimens reviewed included 460 blocks and 183 original slides. Neuroblastoma was confirmed in 138 samples (88.5%), but low concordance rates for Shimada classification ( $n = 39$ ; 25.0%), mitotickaryorrhectic index ( $n = 4$ ; 2.5%), and International Neuroblastoma Pathology Classification ( $n = 18$ ; 11.5%) were noted. Manual MYCN IHC performed on 120 specimens showed conclusive results in 89.2% (28 positive, 23.4%; 79 negative, 65.8%) and questionable results in 10.8% ( $n = 13$ ).

**Conclusions.**—This retrospective CPR highlights the need for a CPR program to serve this region, to ensure correct diagnosis and subclassification of NB, and to provide manual MYCN IHC—with reflexing to fluorescence in situ hybridization, if questionable. This approach can further regional collaboration, enhance test utilization, and ultimately improve patients' outcomes.

(Arch Pathol Lab Med. 2021;145:214–221. Doi: 10.5858/arpa.2019-0570-OA).

Established in 1998, the Asociación de Hemato-Oncología Pediátrica de Centro América (AHOPCA) is a consortium of pediatric oncology centers from Central American and Caribbean region countries, including Nicaragua, Guatemala, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Panamá, Haiti, and the Dominican Republic. The AHOPCA group has developed shared clinical guidelines and adopted cooperative regional pediatric oncology treatment protocols to advance the care provided and improve the survival of children with cancer from these countries. Although the overall outcome of children with cancer from the AHOPCA region has improved over time because of advances in local clinical capacity, improvements in supportive care, and the use of adapted multicenter regional standardized clinical guidelines,<sup>1–4</sup> there is still no uniform dependability in the pathologic diagnosis in this region. Some centers have excellent pathology diagnostic capability, whereas others still struggle with many constraints. Moreover, adequate histologic subclassification of specific tumor types, such as neuroblastoma (NB), that can impact risk stratification and ultimately affect treatment and outcomes is not always provided.

When clinicians or pathologists from the AHOPCA region are confronted with challenging cases, they traditionally seek out expert second opinion outside the AHOPCA region.<sup>5</sup> However, in the last few years we have been working to uniformly improve the quality of the local pathology service provided in this limited-resource area.<sup>6</sup> We have encouraged collaboration among the AHOPCA pathology laboratories to optimize resource use and to eventually become a self-sufficient pathology regional network that can deliver adequate diagnostic support to the clinical services in the AHOPCA countries.

For many years centralized pathology review by expert pathologists has been successfully used as a strategy for quality assurance and to improve diagnostic accuracy. Therefore, we sought to perform a centralized retrospective pathology review of a cohort of patients with a diagnosis of NB and treated under a regional NB guideline (AHOPCANB2012) with the main objectives of: (1) examining the

histologic characteristics of specimens derived from this cohort of patients and assessing how accurate the information provided in the original pathology report was; (2) evaluating the usefulness of performing MYCN immunohistochemistry (IHC) manually in a region with limited resources; (3) using NB as a model to identify the needs for the implementation of an independent and successful central pathology review (CPR) program to serve the AHOPCA region. Such a CPR program can ensure the correct pathology diagnosis, provide more accurate information for treatment guideline data analysis, and in some instances may influence the treatment selection (if performed prospectively as rapid central review), with the potential to impact patients' outcomes.

The risk assignment and treatment selection of patients with NB are significantly affected by proper morphologic classification (Modified Shimada Classification and the International Neuroblastoma Pathology Classification [INPC]),<sup>7,8</sup> and by the determination of some biologic features, such as MYCN status.<sup>9</sup> Thus, in addition to verifying the original diagnosis and its proper morphologic classification and subclassification, we sought to investigate the feasibility for a CPR center in the AHOPCA region to perform any additional assays that are necessary for the adequate risk stratification of these patients with NB, such as verification of MYCN status.

Here, we describe a retrospective CPR of samples collected from patients diagnosed as having NB and treated according to a multicenter regional treatment guideline in countries with limited resources. A subset of these patients had an external second opinion at the time of the initial diagnosis with known MYCN status. The discrepancies and similarities in the histologic evaluation between the original (local) diagnosis and CPR diagnosis will be emphasized. A feasibility analysis of using MYCN IHC performed by hand (manual) at the CPR center as a surrogate for fluorescence in situ hybridization (FISH) to investigate MYCN status in patients with NB will also be discussed.



## Materials and methods

### Cohort

After approval by the Institutional Review Board from all the participating institutions, a retrospective search into the Pediatric Oncology Network Database (POND; [www.pond4kids.org](http://www.pond4kids.org); accessed March 31, 2020)<sup>10</sup> was done to identify all the pediatric patients with a diagnosis of NB in any of the AHOPCA countries between 2012 and 2017 who were treated according to the AHOPCA-NB2012 guidelines. Necessary relevant clinical information, such as age at diagnosis and patient sex, was obtained from the POND database when not available in the original pathology report. We requested all the contributing institutions to submit to the designated CPR center via certified mail a copy of the original pathology report, original hematoxylin-eosin (H&E)-stained slide(s), and at least 1 representative formalin-fixed, paraffinembedded tissue block from all available specimen(s) of each patient with a diagnosis of NB. A further search was performed in our pathology consultation database to investigate if any of these cases had also been submitted to our institution for a second opinion.

### The CPR Center and the Review Process

The Department of Pathology of the Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNNBB) in San Salvador, El Salvador, was chosen to be the CPR center for this retrospective review. This is a well-equipped institutional anatomic pathology laboratory that has consistently demonstrated an overall excellent technical quality and has manual IHC assay available.<sup>6</sup> The cases submitted for central review were first assessed by the HNNBB pathologist (A.P.), who selected the best provided block to be used for any additional IHC (including MYCN immunostain). At least 1 block per case was recut and stained with H&E at HNNBB. If needed, other IHC stains were performed to confirm or to rule out the diagnosis of NB. The final CPR was conducted during 7 days by 2 pathologists (a senior general pathologist from HNNBB with more than 20 years of experience and

a board-certified pediatric pathologist with expertise in pediatric oncology), jointly using a multihead microscope, who were blinded to the original diagnosis or any previous second opinion diagnosis, if available. When the original H&E-stained slides were submitted for review, an overall quality evaluation considering fixation, processing, quality of the tissue section, and quality of the staining was appraised, and the specimens were scored as being of excellent, acceptable, poor, or inadequate quality. In all confirmed NB cases, the Mitotic-Karyorrhectic Index (MKI) and the INPC were assigned, if applicable, and then MYCN immunostaining was performed. If more than 1 specimen was submitted from the same patient (eg, initial biopsy and posttherapy sample), at least 1 sample per patient was stained with MYCN IHC—always giving preference to the specimen that had more representative lesional tissue available.

### **MYCN Immunohistochemistry**

Currently, the IHC menu at HHNBB includes 66 antibodies. MYCN antibody was not available at HHNBB before this CPR. A rigorous validation and optimization process using a mouse monoclonal MYCN antibody (clone NCM II 100, Abcam ab16898) was performed to determine a final optimal dilution of 1:200. A tissue microarray obtained from a cohort of NB cases with known MYCN status by FISH and protein expression level by automated IHC (10 positive cases and 10 negative cases) were used for validation.<sup>11</sup> All the steps of the manual MYCN staining performed in this study were done following the manual IHC protocol currently in use at HHNBB, as previously described.<sup>6</sup> Nuclear positivity was interpreted as evidence of MYCN protein expression; conversely, the absence of nuclear staining was scored as negative. For any case in which the positivity or lack thereof was not convincing, the specimen was categorized as having a questionable MYCN IHC result.

### **Data Collection and Analysis**

The collected data for this study included information obtained from the original pathology reports and the information captured

during the CPR. A comparison between the initial local diagnosis, MKI, and INPC specified in the provided pathology report, and final CPR diagnosis, MKI, and INPC, was done. If the MKI or INPC was not included in the original pathology report, it was recorded as information not provided.

The results of the MYCN IHC performed during the CPR in the confirmed NB cases were noted as positive, negative, questionable, or not performed. A subset of the samples had previously been submitted for a second opinion and had known MYCN gene status by FISH and/or MYCN protein expression level determined by automated IHC, which allowed a comparison between automated versus manual MYCN IHC results performed at HNNBB.

**Table 1.** *Material Submitted for Central Pathology Review of Neuroblastoma by Location*

City/Country	Total No. (%) of Cases in the AHOPCA NB2012 and 2017	Total No. (%) of Patients Not Reviewed	Total No. (%) of Patients Reviewed	Total No. (%) Enrolled of Specimens Reviewed
Guatemala City/ Guatemala	35 of 189 (18.5)	7 of 35 (20.0)	28 of 35 (80.0)	35 of 156 (22.4)
Managua/ Nicaragua	38 of 189 (20.1)	6 of 38 (15.8)	32 of 38 (84.2)	36 of 156 (23.1)
Panama City/ Panama	12 of 189 (6.4)	3 of 12 (25.0)	9 of 12 (75.0)	10 of 156 (6.4)
San Pedro Sula/ Honduras	22 of 189 (11.7)	15 of 22 (68.2)	7 of 22 (31.8)	7 of 156 (4.5)
San Salvador/ El Salvador	39 of 189 (20.6)	9 of 39 (23.1)	30 of 39 (76.9)	44 of 156 (28.2)
Santo Domingo/ Dominican Republic	29 of 189 (15.3)	16 of 29 (55.2)	13 of 29 (44.8)	17 of 156 (10.9)
Tegucigalpa/ Honduras	14 of 189 (7.4)	8 of 14 (57.1)	6 of 14 (42.9)	7 of 156 (4.5)
Total	189 of 189 (100.0)	64 of 189 (33.9)	125 of 189 (66.1)	156 of 156 (100.0)

## Results

### Material Submitted for CPR

We received and reviewed specimens from 125 of 189 patients treated according to the AHOPCA NB2012 guidelines between 2012 and 2017, which represents specimens from 66.1% of the entire cohort. The reasons for the exclusion of 64 cases (33.9%) were: insufficient material available for review, including missing both the block(s) and original pathology report (41 of 64; 64.1%); only the paraffin block(s) was unavailable (13 of 64; 20.3%); the original pathology report was unobtainable (1 of 64; 1.5%); or other nonspecified reasons (9 of 64; 14.1%; Table 1). A total of 156 specimens from 125 patients were analyzed. We reviewed a single sample from 97 patients, 2 samples from 25 patients, and 3 distinct specimens from 3 patients. The materials were submitted from 7 pediatric oncology centers from the AHOPCA region and included 460 paraffin blocks and 183 original H&E-stained slides. The average number of blocks and slides per specimen were 2.9 blocks (range, 0–21) and 1.1 slides (range, 0–16). Most of the specimens examined were from El Salvador (44 of 156; 28.2%), Nicaragua (36 of 156; 23.1%), and Guatemala (35 of 156; 22.4%). The specific number of specimens, the number of submitted blocks, and slides for the CPR per participating centers are outlined in Table 2.

### Clinical Characteristics and Quality of the Submitted Material

The specimens ( $n = 156$ ) submitted for review were obtained from 125 patients: 53 female patients (42.4%) and 72 male patients (57.6%). The mean age at diagnosis was 39.8 months (ranging from 1 month to 15.5 years), with 39 patients younger than 18 months (31.2%), 60 patients with age 18 months to less than 5 years (48.0%), and 26 patients older than 5 years (20.8%) at the time of diagnosis.

The types of procedures performed to obtain the samples were specified in 69.2% of the submitted pathology reports (108 of 156) and included 48 resection specimens (30.8%), 47 incisional biopsies

(30.1%), and 13 core needle biopsies (8.3%). In 48 of 156 samples, the type of procedure was not stated (30.8%). Information indicating that the patient had received preoperative chemotherapy was specified in 17.3% of the submitted pathology reports (27 of 156).

### **Similarities and Divergences in the Diagnosis and Classification of NB**

After light microscopic examination, a final CPR diagnosis was provided for 91.1% of the submitted material (142 of 156), and the diagnosis of NB was confirmed in 138 specimens (138 of 156; 88.5%). The 14 specimens in which a final definitive diagnosis could not be reached included: 3 specimens classified as malignant tumor not otherwise specified (3 of 156; 1.9%); 9 samples in which tumor was not seen (9 of 156; 5.8%); 1 where the material was considered inadequate for morphologic evaluation (1 of 156; 0.6%); and an additional case in which wrong blocks and slides (with a different accession number from the submitted pathology report) were provided for the CPR (1 of 156; 0.6%).

Slightly more than half of the cases were classified at the CPR as NB, Schwannian stroma poor, and poorly differentiated (74 of 142; 52.1%), and the second most common diagnosis was posttherapy NB (25 of 142; 17.6%). Fourteen specimens had a final diagnosis of NB, Schwannian stroma poor, undifferentiated at the CPR (14 of 142; 9.9%)—in all of them, the diagnosis was confirmed with IHC (including positivity for synaptophysin). Other CPR diagnoses included 5 NB, Schwannian stroma poor, differentiating (5 of 142; 3.5%), 13 ganglioneuroblastoma intermixed (13 of 142; 9.2%), 1 ganglioneuroblastoma nodular (1 of 142; 0.7%), and 6 cases of NB not otherwise specified (6 of 142; 4.2%). The 4 cases in which the diagnosis of NB was not confirmed (4 of 142; 2.8%) included 1 adrenal cortical neoplasm (positive for inhibin, Melan-A, and cytokeratin, but negative for synaptophysin and chromogranin), 1 pelvic immature teratoma, 1 B-cell lymphoblastic lymphoma (CD45+, CD20+, and TdT<sup>+</sup>, but negative for CD3 and synaptophysin), and a case of myeloid sarcoma involving the frontal region

(CD45+, CD43+, MPO+, and CD117+, but negative for CD1a, cytokeratin, desmin, and synaptophysin).

The correlation between the original (local) diagnosis specified in the provided pathology report and the CPR is outlined in Figure 1. Whereas the diagnosis of NB was confirmed in 88.5% of the specimens, a complete agreement between original and final CPR diagnosis with a proper modified Shimada subclassification was observed in only 39 specimens (39 of 156; 25.0%). The similarities and discrepancies between the MKI and the final INPC assigned at the CPR, when applicable, and the MKI and INPC specified in the original diagnosis were also assessed and showed a much lower agreement rate, with 2.5% for MKI (4 of 156) and 11.5% for the INPC (18 of 156; Figure 2).

The 183 original H&E-stained slides received for review were obtained from 80 specimens. The slides were graded as excellent in 10.0% of the specimens (8 of 80), acceptable in 58.8% (47 of 80), poor in 26.2% (21 of 80), and inadequate in 5.0% (4 of 80). The microscopic evaluation at the CPR of the remaining 76 specimens (48.7%) was exclusively based on slides cut and stained at HNNBB (no original slides were provided for review).

**Table 2.** *Specific Number and Percent of Specimens, Blocks, and Slides Submitted for the Central Pathology Review per Participating Centers*

City/Country	No. (%) of Specimens Submitted for Review	No. (%) of Blocks Submitted for Review	Average No of Blocks (Range)	No. (%) of Original H&E Slides Submitted for Review No. (%)	Average No of H&E Slides (Range)
Guatemala City/ Guatemala	35 of 156 (22.4)	48 of 460 (10.4)	1.3 (0–6)	48 of 183 (26.2)	1.3 (0–6)
Managua/ Nicaragua	36 of 156 (23.1)	173 of 460 (37.6)	4.8 (1–21)	0 of 183 (0.0)	0.0 (0–0)
Panama City/ Panama	10 of 156 (6.4)	35 of 460 (7.6)	3.5 (1–21)	42 of 183 (23.0)	4.2 (2–8)
San Pedro Sula/Honduras	7 of 156 (4.5)	15 of 460 (3.3)	2.1 (1–8)	0 of 183 (0.0)	0.0 (0–0)

San Salvador/ El Salvador	44 of 156 (28.2)	140 of 460 (30.5)	3.1 (1–6)	53 of 183 (29.0)	1.2 (0–16)
Santo Domingo/ Dominican Republic	17 of 156 (10.9)	30 of 460 (6.5)	1.7 (0–10)	27 of 183 (14.8)	1.5 (0–4)
Tegucigalpa/ Honduras	7 of 156 (4.5)	19 of 460 (4.1)	2.7 (1–5)	13 of 183 (7.0)	1.8 (0–7)
Total	156 of 156 (100.0)	460 of 460 (100.0)	2.9 (0–21)	183 of 183 (100.0)	1.1 (0–16)

Abbreviation: H&E, hematoxylin-eosin staining.

**Figure 1.** Multinational retrospective central pathology review of neuroblastoma. Correlation between original diagnosis and central pathology review diagnosis. Green area, agreement between original diagnosis and central review diagnosis (n 39 of 156; 25%). \*Wrong material submitted for review. †Original diagnoses of “not neuroblastoma”: Ewing sarcoma, clear cell sarcoma of kidney, primitive neuroectodermal tumor, adrenal cortical tumor, immature teratoma, ganglio- blastoma, and Wilms tumor; ‡Central review diagnoses of “not neuroblastoma”: adrenal cortical tumor, immature teratoma, B-cell lymphoblastic lymphoma, and myeloid sarcoma. Abbrevia- tions: GNB, ganglioneuroblasto- ma; NB, neuroblastoma; NOS, not otherwise specified; SSP, Schwannian stroma poor.

Original Diagnoses	Inadequate sample (N=2)									1						1
	No tumor seen (N=10)									2	2					6
	Malignant Tumor, NOS (N=23)	5	12							2	1		1	2		
	Not Neuroblastoma† (N=7)	2								2		3				
	Neuroblastoma, NOS (N=50)	7	33							4	2	1	2			1*
	Post-therapy Neuroblastoma (N=4)									4						
	Ganglioneuroma (N=8)			1	5					1					1	
	GNB, NOS (N=10)			2	5	1				2						
	GNB, nodular (N=0)															
	GNB, Intermixed (N=9)		2		3					4						
	NB, SSP, Differentiating (N=3)		1	1						1						
	NB, SSP, Poorly Differentiated (N=21)	1	17	1						2						
	NB, SSP, Undifferentiated (N=9)	1	7							1						
		NB, SSP, Undifferentiated (N=14)														
		NB, SSP, Poorly Differentiated (N=24)														
		NB, SSP, Differentiating (N=5)														
		GNB, Intermixed (N=13)														
		GNB, nodular (N=1)														
		GNB, NOS (N=0)														
		Ganglioneuroma (N=0)														
		Post-therapy Neuroblastoma (N=25)														
		Neuroblastoma, NOS (N=5)														
		Not Neuroblastoma ‡ (N=4)														
		Malignant Tumor, NOS (N=3)														
		No tumor seen (N=9)														
		Inadequate Sample (N=2)														
Central Review Diagnoses																









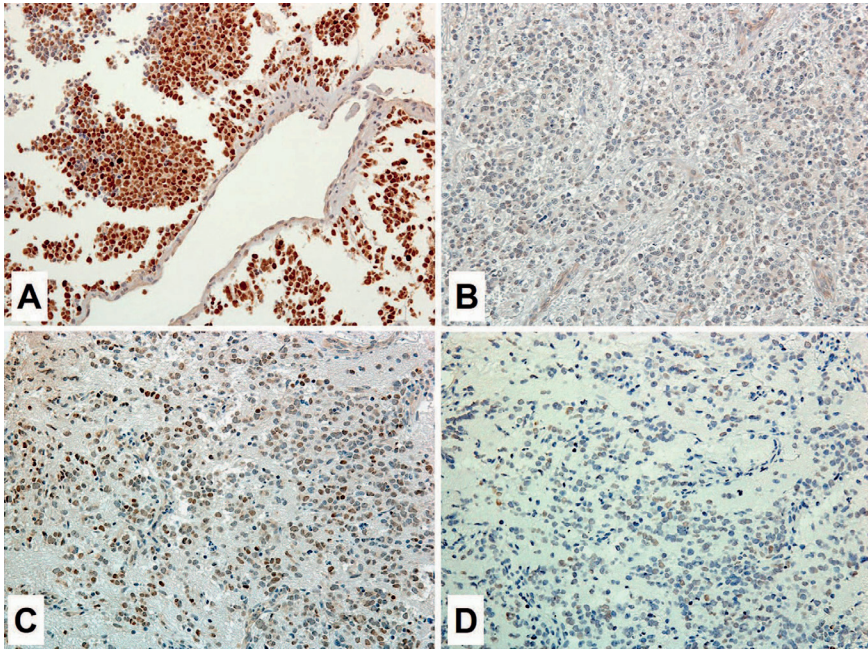
---

Revista La Universidad - N.º 3 y 4, julio - diciembre de 2022

were compared. A total of 9 samples were rescored as negative (9 of 13; 69.2%), and 2 cases showed focal but unequivocal positivity (2 of 13; 15.4%). In the remaining 2 questionable cases (2 of 13; 15.4%), a repeated automated MYCN staining could not be performed because no more tissue was available in the blocks.

Specimens from a subset of this cohort (from 32 patients) had been previously submitted for pathology second opinion. The MYCN gene status by FISH was available from 26 patients, and automated MYCN IHC stain results were available for comparison from 31 of 32 cases. A parallel evaluation of the results from the 3 distinct assays is presented in Figure 3, B. For instance, all 7 cases that had MYCN gene amplification previously detected by FISH showed positive MYCN protein expression by both manual and automated IHC. Conversely, an additional 8 cases displayed concordant results with negative FISH, and negative manual and automated IHC. Five cases in which FISH study was not initially performed during the previous pathology second opinion consult showed similar results between the automated and manual IHC. Six cases had questionable manual MYCN IHC results, but when performed using an IHC automated stainer, there was no evidence of MYCN protein expression (negative). Examples of positive, negative, and questionable MYCN by IHC in NB cases during the CPR are presented in Figure 4.

**Figure 4.** *Examples of MYCN immunohistochemistry performed in neuroblastomas during the central pathology review. Positive MYCN result (manual staining procedure) with distinct diffuse and strong nuclear positivity (A); negative MYCN result (manual staining procedure) with mild background staining (1 ) (B); Questionable MYCN result (manual staining procedure) with mild background staining (1 ) and equivocal weak nuclear positivity (C); same case as shown in C, MYCN staining performed with an automated stainer interpreted as negative, 200X (D) (original magnification 3200)*



### Significant Challenges Faced During the Central Review Process

Even though a border control agreement between El Salvador, Guatemala, Honduras, and Nicaragua (Central America-4) has been in effect since 2006, we unfortunately still encountered a considerable delay in clearing customs within the AHOPCA region. Other challenges faced during this CPR were suboptimal packaging of the submitted material, resulting in broken slides and melted paraffin blocks, problems with the identification of some of the samples submitted, such as unclear labeling, and issues with the original pathology report, including discordant date of birth and age for the patient. Delay with the delivery of reagents at the CPR center by the vendors (eg, delivery of the MYCN antibody) occurred, which not only impacted the projected timeline of this review but also emphasized the everyday challenges that some areas of the world (in particular countries with limited resources) need to endure in dealing with setbacks in receiving reagents and necessary supplies.

## Discussion

The practice of performing a CPR for patients enrolled in a multicenter protocol or clinical trial is a well-established procedure and usually includes standardization of the pathologic evaluation. This approach proved to be very influential in the improvements of treatment regimens, in particular for the treatment of oncologic patients. Some examples in the field of pediatric oncology of very impactful CPR have been demonstrated by the Children's Oncology Group and the International Society of Pediatric Oncology.<sup>12–14</sup> Teot et al<sup>15</sup> from the Children's Oncology Group examined the past and present use of the CPR in pediatric oncology and emphasized its efficacy and highlighted the applicability of a rapid (prospective) central review. The authors also pointed out the effect that discrepancies between the original diagnosis and the final CPR diagnosis could cause by bringing up concerns regarding the appropriateness of the actions taken before the retrospective pathology review. On the other hand, the usefulness of a retrospective CPR as an assessment tool to investigate the accuracy of the diagnosis and adequacy of the data provided in the pathology report as a quality metric is seemingly convincing.

In the context of the AHOPCA region, a CPR appeared very beneficial and in line with our goal of uniform regional pathology development. Hence, in this retrospective CPR of 156 specimens from 125 patients with a diagnosis of NB and treated under the same NB2012-AHOPCA guidelines, the original diagnosis of NB was confirmed in 88.5% of the specimens (138 of 156). However, an agreement between the original and revised histologic subclassification of the NB was noted in only 25.0% of the specimens (39 of 156). The most common reasons for this discrepancy were the lack of morphologic subclassification—33 specimens were initially signed out as NB but without further specification or subclassification (not otherwise specified)—when in fact they should have been classified as NB, Schwannian stroma poor, poorly differentiated (33 of 156, 21.2%). Another important reason for the discrepancy was the inappropriate subclassification of postchemotherapy NB specimens (21 specimens) when the posttherapy status precludes a histologic subclassification (21 of 156; 13.5%).

The age-associated histologic classification of NB combines the amount of Schwannian stroma content, degree of neuroblastic differentiation, and MKI, and in the end leads to the subcategorization in a favorable or unfavorable histopathology subgroup. It is apparent in this CPR that this subclassification is not consistently applied by the AHOPCA pathologists, even though it was implemented about 20 years ago.<sup>7</sup> In fact, an agreement between the assigned MKI was observed in only 4 of 156 specimens (2.5%), and the initially given INPC and final CPR INPC were similar in only 18 specimens (18 of 156; 11.5%). In 127 specimens INPC was not specified in the original pathology report, but after CPR, 48 patients were categorized as having unfavorable histology and 28 patients classified with favorable histopathology. The other 51 cases remained without an assigned INPC. Indeed, it was not applicable in 42 samples, and it could not be determined in 9 specimens. The INPC category in NB is used to help determine the risk grouping of these patients and guide treatment selection. Therefore, not only is the exact diagnosis important, but providing adequate histologic subclassification and the INPC are also essential for the correct treatment of a patient with NB.

The second objective of this study was to implement manual MYCN IHC at HNNBB and evaluate its reliability compared with automated IHC and/or FISH assay to determine the MYCN status of patients with NB. The benchmark method to determine the MYCN status in patients with NB is FISH. We have previously demonstrated that automated IHC has a 91.66% sensitivity and 96.29% specificity compared with MYCN FISH in a pilot study of 78 patients.<sup>11</sup> In this present study, manual MYCN IHC was performed in 120 specimens, with a definitive result in 89.2% (107 specimens), including 28 that showed bona fide evidence of MYCN protein expression (28 of 120; 23.3%) and 79 specimens (65.8%) with negative MYCN IHC. However, unlike when using the automated IHC stainer, there was a subset of the cases (10.8%) in which the interpretation of the IHC slide was equivocal—likely due to the background staining, which led to a questionable result (13 of 120 specimens). When repeated with an automated staining procedure, 11 of 13 questionable manual MYC IHC results showed negative IHC in 9 of them (9 of 13; 62%),



and 2 cases showed focal positivity (15.4%, 2 of 13). It is always our recommendation to reflex any questionable IHC result (manual or automated) to FISH testing.

Only a small number of cases in this cohort had FISH and/or automated IHC results previously done and available for comparison. However, the correlation between the 3 assays was very promising. For instance, all of the cases with the MYCN gene amplified by FISH exhibited evidence of protein expression by both automated and manual IHC. A single specimen classified as unfavorable histology that was previously reviewed and had MYCN gene not amplified, and negative automated IHC was interpreted as positive for protein expression by manual IHC. Another previously reviewed case, a post-therapy neuroblastoma specimen, showed questionable manual IHC results, but when stained by automated stainer, it was interpreted as positive for MYCN protein overexpression (FISH study was not previously performed in this case; Figure 3, B). The relatively low percentage of questionable results (10.8%) is very encouraging and can drastically decrease the number of cases that would require reflex to FISH and consequently would reduce the expenses in settings with limited resources. Moreover, centralizing the implementation of an MYCN IHC assay in a single center that could attend to the entire AHOPCA region seems to be not only an excellent cost-saving strategy but also important for capacity building and empowerment for this limited-resource region. In many low-income countries, such as those in the AHOPCA region, most of the pathologists are generalists and lack subspecialty training. The retrospective pathology review process itself provides an excellent opportunity for capacity building and the creation of regional expertise. For instance, the HNNBB had 39 patients with a diagnosis of NB between 2012 and 2017, which gives an average of 7.8 cases per year. During the 1 week of centralized review, the pathologist from HNNBB (A.P.) was exposed and able to jointly review 156 specimens, which would represent the number of NBs this pathologist would typically examine from HNNBB in 20 years. However, to ensure that a retrospective review can be a valuable setting for training, a prospective phase of diagnostic capability verification will need to take place.

A retrospective pathology review process involving multiple centers, in particular from different countries, is not exempt from its challenges, in particular in areas with limited resources. The cost of submitting samples by mail, as well as the time for clearing customs, needs to be carefully considered. The use of digital pathology may be a potential solution to minimize these issues,<sup>16,17</sup> although the upfront investment necessary to acquire slide scanners, for example, would also need to be taken into consideration. A consistently high-quality H&E slide is also required before we contemplate the use of digital pathology. In that regard, unfortunately, 31.3% (25 of 80) of the original H&E-stained slides submitted for review still demonstrated poor or inadequate quality. Actions to consistently improve fixation, processing, the quality of the sectioning, and the quality of the staining in all anatomic pathology laboratories of the AHOPCA region have been our primordial goal. However, this study shows that we still have room for improvement. Another fundamental issue revealed by this retrospective pathology review was the lack of well-organized storage of pathology material in the AHOPCA laboratories, leading to missing paraffin blocks or unavailable pathology report(s).

Taken together, the results observed in this retrospective multi-center review of NB specimens highlight the need for the implementation of a CPR program to serve underserved regions. A CPR center would ensure that the correct pathology diagnosis is provided—including all the necessary subclassification to guide the treatment selection of patients with NB. Our next step is to initiate a prospective rapid review of all the NB cases from the AHOPCA region and to provide manual MYCN IHC to all confirmed NB cases, reflexing to FISH assay any questionable result; however, the use of a strict quality assurance program to validate the performance of the regional pathology referral center would be needed. This approach will further promote regional collaboration, improve test utilization, and ultimately impact the outcome of pediatric patients in this limited-resource region. A similar strategy of implementing a regional pathology referral center can be considered by other areas of the world where pathology expertise and resources are also limited.

The cost of performing a pathology review at a regional CPR center consists of consumables, reagents, personnel (eg, pathologists and technologists), and shipment fees. Whereas the initial operation of a CPR program can be achieved with the aid of external grants, the involvement of local government bodies and other regional sponsors is fundamental to the maintenance of such initiative in the long term. The main concept necessary to perpetuate this type of collaborative work is to make the key regional stakeholders comprehend that the cash invested in having an accurate diagnosis and correctly risk stratifying these patients will have the potential to impact patients' outcomes and, ultimately, represent savings by not spending money treating a patient based on a wrong diagnosis.

## **References**

1. Luna-Fineman S, Barnoya M, Bonilla M, Fu L, Baez F, Rodriguez-Galindo C. Retinoblastoma in Central America: report from the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA). *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 58(4):545–550.
2. Castellanos EM, Barrantes JC, Baez LF, et al. A chemotherapy only therapeutic approach to pediatric Hodgkin lymphoma: AHOPCA LH 1999. *Pediatr Blood Cancer*. 2014; 61(6):997–1002.
3. Navarrete M, Rossi E, Brivio E, et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in central America: a lower-middle income countries experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2014; 61(5):803–809.
4. Ceppi F, Ortiz R, Antillon F, et al. Anaplastic large cell lymphoma in Central America: a report from the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA). *Pediatr Blood Cancer*. 2016; 63(1):78–82.



5. Santiago TC, Jenkins JJ. Histopathologic diagnosis of pediatric neoplasms: a review of international consultations. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137(11):1648–1653.
6. Santiago T, Hayes C, Polanco AC, et al. Improving immunohistochemistry capability for pediatric cancer care in the Central American and Caribbean region: a report from the AHOPCA Pathology Working Group. *J Glob Oncol*. 2018; 4:1–9.
7. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999; 86(2):364–372.
8. Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clinl Oncol*. 2009; 27(2):289–297.
9. Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST, et al. Detection of N-myc gene amplification by fluorescence in situ hybridization: diagnostic utility for neuroblastoma. *Am J Pathol*. 1993; 142(5):1339–1346.
10. Quintana Y, Patel AN, Arreola M, Antillon FG, Ribeiro RC, Howard SC. POND4Kids: a global web-based database for pediatric hematology and oncology outcome evaluation and collaboration. *Stud Health Technol Inform*. 2013; 183:251–256.
11. Santiago T, Tarek N, Boulos F, et al. Correlation between MYCN gene status and MYCN protein expression in neuroblastoma: a pilot study to propose the use of MYCN immunohistochemistry in limited-resource areas. *J Glob Oncol*. 2019(5):1–7.
12. Vujanic GM, Sandstedt B, Kelsey A, Sebire NJ. Central pathology review in multi-center trials and studies: lessons from the nephroblastoma trials. *Cancer*. 2009; 115(9):1977–1983.

13. Jackson TJ, Williams RD, Brok J, et al. The diagnostic accuracy and clinical utility of pediatric renal tumor biopsy: report of the UK experience in the SIOP UK WT 2001 trial. *Pediatr Blood Cancer*. 2019; 66(6):e27627.
14. Vujani 'c GM, Gessler M, Ooms AHAG, et al. The UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol. *Nat Rev Urol*. 2018; 15(11):693–701.
15. Teot LA, Sposto R, Khayat A, Qualman S, Reaman G, Parham D. The problems and promise of central pathology review: development of a standardized procedure for the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol*. 2007; 10(3):199–207.
16. Mroz P, Parwani AV, Kulesza P. Central pathology review for phase III clinical trials: the enabling effect of virtual microscopy. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137(4):492–495.
17. Hedvat CV. Digital microscopy: past, present, and future. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134(11):1666–1670. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134(11):1666–1670.

# Bridging the Gap in Access to Care for Children With CNS Tumors Worldwide

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Accepted on March 3, 2020 and published at [ascopubs.org/journal/go](https://ascopubs.org/journal/go) on April 15, 2020; DOI <https://doi.org/10.1200/GO.20.00047>. Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives 4.0

Daniel C. Moreira, MD<sup>1</sup>; Revathi Rajagopal, MD<sup>2</sup>; Regina M. Navarro-Martin del Campo, MD<sup>3</sup>; Ana C. Polanco, MD<sup>4</sup>; Ana Patricia Alcasabas, MD<sup>5</sup>; Luis A. Arredondo-Navarro, MD<sup>3</sup>; Danny Campos, MD<sup>6</sup>; Sandro Casavilca-Zambrano, MD, MPH<sup>7</sup>; Rosdali Yesenia Diaz Coronado, MD<sup>7</sup>; Nor Faizal, MBBS, MS, DPhil<sup>2</sup>; Dharmendra Ganesan, MBBS, MS<sup>2</sup>; Syed Ahmer Hamid, MD<sup>8</sup>; Rafeah Khan, MD<sup>8</sup>; Kathleen Khu, MD<sup>5</sup>; Jasmin Loh, MBChB<sup>2</sup>; Marissa Lukban, MD<sup>5</sup>; Tatiana Negreiros, MD<sup>7</sup>; Estuardo Pineda, MD<sup>4</sup>; Nausheen Yaqoob, MD<sup>8</sup>; Nida Zia, MD<sup>8</sup>; Amar Gajjar, MD<sup>1</sup>; Carlos Rodriguez-Galindo, MD<sup>1</sup>; Ibrahim Qaddoumi, MD, MS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN; <sup>2</sup>University of Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia; <sup>3</sup>Hospital Civil de Guadalajara Dr. Juan I. Menchaca, Guadalajara, Mexico; <sup>4</sup>Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom, San Salvador, El Salvador; <sup>5</sup>University of the Philippines, Philippine General Hospital, Manila, Philippines; <sup>6</sup>Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, Lima, Peru; <sup>7</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Lima, Peru; <sup>8</sup>University of Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia.

With more than 40,000 CNS tumors diagnosed in children and adolescents every year worldwide, CNS tumors are a leading cause of cancer morbidity and mortality in these patients.<sup>1</sup> The complexity of elements needed to provide quality care is substantial, with integration of comprehensive multidisciplinary care comprising accurate pathologic and radiologic diagnosis, neurosurgery, radiation therapy, chemotherapy, rehabilitation, and close monitoring for acute complications and long-term effects. Unfortunately, most children with CNS tumors are diagnosed in low- and middle-income countries (LMICs) where health systems are frequently not adequately equipped to manage such complex cases.<sup>2</sup> In addition, data on the

incidence, survival, and burden of CNS tumors is currently scant at best, even more so than for other childhood cancers.<sup>3</sup>

Although international collaborations to improve the outcomes of children with cancer through the implementation of capacity-building, research, and education is an effective and sustainable strategy, such efforts have historically not prioritized CNS tumors.<sup>4</sup> With increased global support, evidenced by the WHO Global Initiative for Childhood Cancer, special attention must now focus on building capacity to care for children with CNS tumors.<sup>5</sup>

CNS malignancies comprise a widely varied collection of diagnoses with markedly disparate outcomes, from low-grade tumors to incurable neoplasms.<sup>6</sup> Furthermore, advances in genomic medicine have redefined their classification and have impacted treatment in ways that one decade ago were not considered possible. Many CNS tumor types, once thought of as single entities, compose multiple subgroups with distinct clinical and molecular characteristics.<sup>7</sup> However, despite the growing list of molecular aberrations identified in pediatric CNS tumors, proven efficacious molecular based treatments are still limited. Nonetheless, early adoption of these insights could lead to accelerated progress around the world.

To help bridge the gap in outcomes for pediatric CNS tumors in LMICs, St. Jude Children's Research Hospital (St. Jude) launched the first St. Jude Global Academy Neuro-Oncology Training Seminar, which is a blended course in pediatric neuro-oncology with a focus on LMIC needs. The course focuses on teams of specialists who care for children with CNS tumors (oncologists, neurosurgeons, neurologists, radiologists, pathologists, and radiation oncologists) and seeks to provide knowledge and skills that are globally applicable in the context of multidisciplinary care. After systematic creation of the curriculum, course elements were defined by a needs assessment survey that included an evaluation of team dynamics, treatment capacity, and educational goals. The first component was a 9-week online course, and the second was a workshop at the St. Jude campus with 20 participants from seven countries. The workshop, held

in November 2019, sought to consolidate acquired knowledge and, more importantly, to share experiences and start to generate ideas for impactful interventions and collaboration.

During the course, barriers to quality care were discussed extensively among participants from different specialties, geographic regions, and health care contexts. Importantly, systematic evaluations of treatment barriers for children with CNS tumors in LMICs are limited.<sup>8,9</sup> Salient barriers that were discussed included (1) an absence of coordinated multidisciplinary care; (2) an inability to subspecialize or concentrate on neuro-oncologic diseases; (3) limited infrastructure, including neurosurgical, laboratory, radiotherapy, and rehabilitation facilities; (4) delays in referrals between specialties; (5) postsurgical morbidity; (6) insufficient hospital- and population-based data; (7) treatment abandonment; and (8) an increasing discord between recent molecular insights and the current clinical context in LMICs. Understanding such barriers is a first step to reducing them. Workshop participants also noted that past improvements in care were based on (1) establishment of multidisciplinary teams and regular team meetings; (2) the dedication of knowledgeable, passionate individuals; (3) institutional, regional, and international collaborations; and (4) optimization of available resources.

To work toward the goal of providing high-quality care for children with CNS tumors in LMICs, workshop participants formed the Global Alliance for Pediatric Neuro-Oncology (GAP-NO). To our knowledge, this is the first multinational, multidisciplinary group focusing on pediatric CNS tumors in LMICs. The mission of GAP-NO is to improve access to quality care and outcomes for children with CNS tumors globally through multidisciplinary collaboration, education, generation and adaptation of knowledge, and optimization of resources. This alliance can be leveraged to increase advocacy for children with CNS tumors across the world, thus increasing visibility of this disease burden.

Because data and literature that report CNS tumor outcomes from LMICs is largely lacking, this must also be a global priority.

Recognizing the true burden of disease and current outcomes will facilitate identifying the interventions needed to improve survival and quality of life. In addition, understanding the heterogeneity of resources available in different contexts will expedite the development of tailored treatment protocols for differing health systems and hospital infrastructures.

Narrowing the survival gap in LMICs poses an enormous challenge, but partnerships among institutions with the similar challenges can be leveraged to define successful interventions. International and interdisciplinary collaborations and initiatives are needed to improve the outcomes of children with CNS tumors in LMICs. Ultimately, these vulnerable patients must be included in national health agendas as a priority point of action to fully implement change. Cures should be limited only by our understanding of diseases, not by the availability of care.

### **Corresponding author**

Daniel C. Moreira, MD, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, MS-271, Memphis, TN 38105; e-mail: [daniel.moreira@stjude.org](mailto:daniel.moreira@stjude.org).

### **Author contributions**

Conception and design: All authors

Financial support: Daniel C. Moreira

Administrative support: Daniel C. Moreira, Ana C. Polanco, Amar Gajjar

Collection and assembly of data: All authors

Data analysis and interpretation: All authors

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

### **Authors' disclosures of potential conflicts of interest**

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered com-

pensated unless otherwise noted. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst =My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to [www.asco.org/rwc](http://www.asco.org/rwc) or [ascopubs.org/go/site/misc/authors.html](http://ascopubs.org/go/site/misc/authors.html). Open Payments is a public database containing information reported by companies about payments made to US-licensed physicians (Open Payments). Rosdali Yesenia Diaz Coronado Honoraria: Merck Sharp & Dohme Amar Gajjar Research Funding: Genentech (Inst), Kazia Pharmaceutical (Inst) No other potential conflicts of interest were reported.

## References

1. GBD 2017 Childhood Cancer Collaborators: The global burden of childhood and adolescent cancer in 2017: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Oncol* 20:1211-1225, 2019
2. Ward ZJ, Yeh JM, Bhakta N, et al: Estimating the total incidence of global childhood cancer: A simulation-based analysis. *Lancet Oncol* 20:483-493, 2019
3. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al: Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 391:1023-1075, 2018
4. Rodriguez-Galindo C, Friedrich P, Alcasabas P, et al: Toward the cure of all children with cancer through collaborative efforts: Pediatric oncology as a global challenge. *J Clin Oncol* 33:3065-3073, 2015
5. World Health Organization: Global Initiative for Childhood Cancer. <http://www.who.int/cancer/childhood-cancer/en/>

6. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al: International incidence of childhood cancer, 2001-10: A population-based registry study. *Lancet Oncol* 18:719-731, 2017
7. Gajjar A, Bowers DC, Karajannis MA, et al: Pediatric brain tumors: Innovative genomic information is transforming the diagnostic and clinical landscape. *J Clin Oncol* 33:2986-2998, 2015
8. Baskin JL, Lezcano E, Kim BS, et al: Management of children with brain tumors in Paraguay. *Neuro Oncol* 15:235-241, 2013
9. Chan MH, Boop F, Qaddoumi I: Challenges and opportunities to advance pediatric neuro-oncology care in the developing world. *Childs Nerv Syst* 31:1227-1237, 2015



# Improving Immunohistochemistry Capability for Pediatric Cancer Care in the Central American and Caribbean Region: A Report From the AHOPCA Pathology Working Group

**Corresponding author:** Teresa Santiago, MD, Department of Pathology, St Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, MS 250, Memphis, TN 38105-3678;  
e-mail: [Teresa.Santiago@stjude.org](mailto:Teresa.Santiago@stjude.org).

**DOI:** <https://doi.org/10.1200/JGO.17.00187>

**Published** online on [jgo.org](http://jgo.org) on March 13, 2018.

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Teresa Santiago; Caleb Hayes; Ana Concepción Polanco; Lisa Miranda; Argelia Aybar; Belkis Gomero; Elizabeth Orellana; Fabienne Anglade; Mázlova Luxely Toledo; González Eduviges Ruiz; Moisés Espino Durán; Carlos Rodríguez Galindo; Monika L. Metzger

## Executive summary

Accessibility to immunohistochemistry (IHC) is invaluable to proper diagnosis and treatment of pediatric patients with malignant neoplasms. Whereas IHC is widely available in anatomic pathology laboratories in high-income countries, access to it in anatomic pathology laboratories of low- and middle-income countries remains a struggle, with many limitations. To advance the quality of the pathology service offered to children with cancer in areas with limited resources, a 5-day pathology training workshop was offered to pathologists and histotechnologists from various countries of the Central American and Caribbean region. An initial assessment of the workshop participants' current laboratory capacities was performed, and a regional training center was selected. Didactic and hands-on activities were offered, and review and evaluation of the IHC slides produced during the training course were compared with original slides from the participants' sites. This model of intensive 5-day training appears to be effective and can potentially be used in other budget-constrained regions. Moreover, it can serve as a continuing education activity for pathologists and histotechnologists, and as part of validations and quality improvement projects to build capacity and develop IHC assay proficiency in low- and middle-income countries.

## Introduction

The use of immunohistochemistry (IHC) staining has long been recognized as an indispensable tool in surgical pathology practices to aid in the correct diagnosis and subclassification of the malignant neoplasms.<sup>1,2</sup> An accurate diagnosis guides the clinical decision for proper treatment and consequently improves patients' outcome. Although IHC is readily available and performed in most of the anatomic pathology (AP) laboratories in the developed world, significant limitations and even complete lack of IHC capabilities continue to exist in many AP laboratories in low- and middle-income countries (LMICs).

Since 1998, the pediatric oncology centers in Central America, later joined by the Caribbean countries of Haiti and the Dominican Republic, have formed the Asociación de Hemato- Oncología Pediátrica de Centro América (AHOPCA). In collaboration with St Jude Children Research Hospital (SJCRH; Memphis, TN) and other institutions in North America and Europe, the AHOPCA group has promoted multidisciplinary educational activities and established shared clinical guidelines that have generated successful results through the years.<sup>3-14</sup> Unfortunately, a significant gap and disparity in the level of the pathology services offered among these countries still exist, leading local oncologists and pathologists to request frequent second opinions from SJCRH. A previous analysis of cases submitted to SJCRH in consultation have shown a high index of incorrect diagnosis in the region, and the lack or poor quality of IHC assays was assumed to be one of the contributing factors.<sup>15</sup>

As part of a recently awarded P30 Cancer Center supplement (Grant No. 3P30CA021765-37S2) to promote clinical research studies in Burkitt lymphoma in LMICs, the pathologists from the Central America and Caribbean region started to participate in AHOPCA more actively and established the AHOPCA Pathology Working group (AHOPCA-Path). Whereas many factors contribute to the gap and disparity in the level of the pathology services offered in LMICs, we believe educational activities can be a powerful tool for capacity building and can consequently minimize the gap seen in these countries.

**Table 1.** *Characteristics of the Anatomic Pathology Laboratories in the Central America and Caribbean Region*

Country	Type of Laboratory	No. Of Pathologists	No. of Technicians	No. of Surgical Specimens per Year	Use Proper Tissue Fixation* (yes/no)	No. of H&E Slides per Year	Type of IHC Assay Available	No. of IHC Slides per Year	No. of AB Available	Quality Control Program (yes/no)
Costa Rica	Public	2	4	6,000	Yes	9,600	Manual	450	66	No
Santiago City, DR	Private	6	7	20,000	Yes	93,000	Auto	5,200	120	Yes
Santo Domingo, DR	Public	3	1	1,300	No	3,200	None	n/a	n/a	No
El Salvador	Public	3	4	3,500	Yes	10,400	Manual	2,340	66	No
Guatemala	Private	1	3	5,000	Yes	12,480	Manual	240	54	No
Haiti (Port-au-Prince)	Private	3	2	4,000	No	n/a	None	n/a	n/a	No
Haiti (Mirebelais)*	Public	1	3	1,100	No	n/a	None	n/a	n/a	No
Honduras	Public	6	8	12,000	Yes	39,00	Manual	2,340	50	No
Nicaragua	Public	2	2	1,800	No	5,200	None	n/a	n/a	No
Panama	Public	3	2	1,650	Yes	n/a	Auto	Unknown	64	No

*Abbreviations:* AB, antibody; Auto, automated; DR, Dominican Republic; H&E, hematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; n/a, not available.

\**Tissue* fixed in 10% neutral buffered formalin placed in a volume  $\geq 10$  times the size of the specimen and fixed for  $\geq 6$  hours but not exceeding 72 hours.

†*Over 9 months (October 2016 through June 2017*

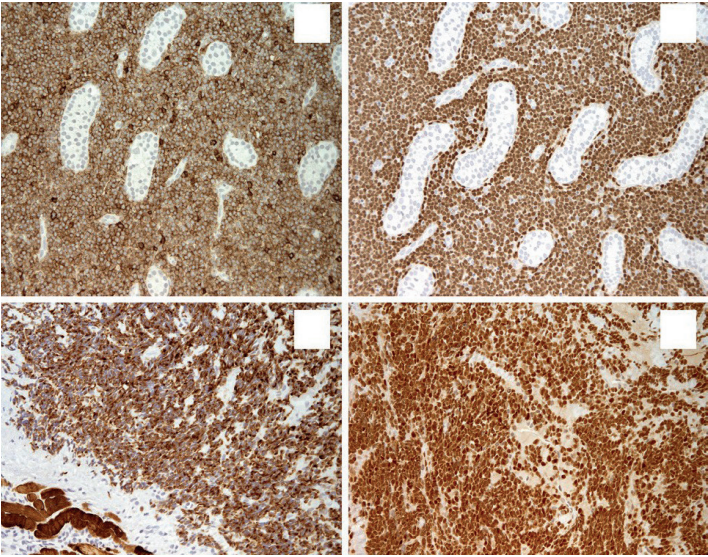
**Table 2.** *Most Common Problems Among Anatomic Pathology Laboratories in Low- and Middle-Income Countries*

Common Problems
Inadequate laboratory infrastructure and/or insufficient physical space
Lack of adequate equipment
Limited resources
Suboptimal and/or inconsistent quality of the histologic slides
Limited IHC capability and high cost of reagents
Unreliable quality of the IHC slides
No specialized (subspecialty) training for pathologists
Lack of opportunities for professional developments (for pathologists and histotechnologists)
No participation in proficiency testing
Nonexistence of quality control, quality assurance, and quality improvement plans

*Abbreviation:* IHC, immunohistochemistry.

As part of our effort to improve the quality of the pathology services offered to children in the region who have cancer, we promoted a 5-day pathology training workshop that focused on IHC. This workshop was provided not only to pathologists but also to histotechnologists. We believe this initiative can improve the technical and specialized knowledge of the participants, and help pathologists and histotechnologists make more appropriate decisions (including cost-saving choices) yet be able to implement proper standards and procedures. This approach may also be used as a model of training, capacity building, and to further develop IHC assay proficiency in other areas of the world with limited resources. Furthermore, local capacity training will lead to diagnostic independence and reduce the burden of second-opinion consultations while empowering the local pediatric oncology units and, ultimately, improve the outcomes of children with cancer.

**Figure 1.** Micrographs of sample slides from the immunohistochemistry assay performed by hand at Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, San Salvador, El Salvador. (A, B) Testis involved by lymphoblastic lymphoma, which is immunoreactive for (A) CD45 and (B) terminal deoxynucleotidyl transfer- ase. (C, D) Tissue slides from a case of rhabdomyo- sarcoma that show diffuse positivity for (C) desmin and (D) Myo-D1. Magnification, ×200



**Table 3.** Manual Immunohistochemistry Staining Procedure Used at Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom, San Salvador, El Salvador

No	Step	Action/Solution	Repetition	°C	Time (min)
1	Tissue sections and control tissue	Cut 3-µm thick sections and let dry	—	60	30
2	Tissue deparaffinization and rehydration	Heat slides in an oven	1	R/T	5
		Wash slides in xylene	3	R/T	3
		Wash slides in 100% ethanol	3	R/T	3
		Rinse slides in distilled water	2	R/T	60
3	Antigen retrieval*	Place slides in antigen retrieval solution in steamer†	1	60	30
		Leave slides within antigen retrieval solution	1	R/T	3
		Rinse slides in distilled water	1	R/T	5

4 Inactivate endogenous peroxidase		Cover tissue with 3% hydrogen peroxide	1	R/T	5
		Wash slides in $\times 1$ TBS, pH 7.6	2	R/T	5
5 Protein block‡		0.4% Casein in phosphate-buffered saline	1	R/T	5
		Wash slides in $\times 1$ TBS, pH 7.6	2	R/T	60
6 Primary antibody§		Apply primary antibody and incubate in humidified chamber	1	R/T	5
		Wash slides in $\times 1$ TBS, pH 7.6	2	R/T	30
7 Secondary antibody (postprimary)‡		Apply secondary antibody and incubate in humidified chamber (rabbit anti-mouse IgG ( $< 10 \mu\text{g/mL}$ ))	1	R/T	5
		Wash slides in $\times 1$ TBS, pH 7.6	2	R/T	30
8 Polymer solution‡		Apply polymer solution and incubate in humidified chamber (anti-rabbit poly-HRP-IgG)	1	R/T	5
		Wash slides in $\times 1$ TBS, pH 7.6	2	R/T	5
9 Developer		Add DAB substrate to the slides and incubate in a humidified chamber	1	R/T	3
		Rinse slides in distilled water	1	R/T	3
10 Counterstain		Hematoxylin	1	R/T	3
		Rinse slides in distilled water	1	R/T	5
11 Dehydrate tissue		Wash slides in 100% ethanol	1	R/T	3
		Wash slides in xylene	3	R/T	5
12 Mount coverslips		Use permanent mounting medium	3		

*Abbreviations:* DAB, diaminobenzidine; IgG, immunoglobulin G; R/T, room temperature ( $22^{\circ}\text{C}$  to  $24^{\circ}\text{C}$ ); TBS, Tris-buffered saline; Temp, temperature.

\**Optimization* of the antigen retrieval buffer and working condition must be performed for each antibody.

‡*Slides* placed in solution only after the temperature reaches  $60^{\circ}\text{C}$ .

‡*Novolink* Polymer Detection Systems (Novocastra; Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL).

§*Antibody* dilution must be previously optimized;  $\times 1$  TBS (50 mM Tris-Cl [6.05 g of TRIS], 150 mM NaCl [8.76 g], distilled water [1 L], pH 7.6; DAB (1.74% weight-to- volume ratio 3,3'- diaminobenzidine in a stabilizer solution).

## The current state

The main characteristics of the AP laboratories from the AHOP-CA member institutions are outlined in Table 1. Some AP laboratories in this area demonstrate overall good quality. However, a significant inequality in the infrastructure and capability of the AP

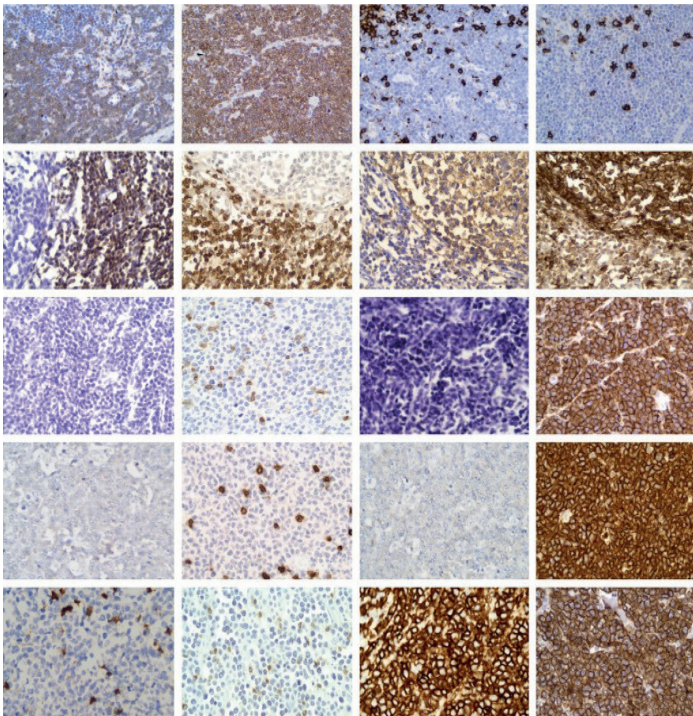
laboratories is noted, ranging from private and well-equipped laboratories with existing automated IHC assays to public (institutional) laboratories that are restricted only to morphologic examination of hema- toxylin and eosin (H&E)-stained slides and struggle with limitations in laboratory supplies imposed by economic restrictions. For many years, SJCRH has been offering second-opinion pathology diagnoses to the AHOPCA group. We have noticed that one of the leading reasons to submit a case in consultation is the impossibility of the local pathologists to further classify a neoplastic process because of the lack of IHC or poor IHC quality. Also, inadequate tissue fixation and suboptimal histologic sections are common issues that can substantially affect the ability to reach the correct diagnosis. Lack of quality-control activities and inappropriate IHC antibody optimization and validation were seen among some of the participants' centers.

During the workshop, all the pathologists were asked to give a 30-minute presentation using a previously provided template. The participants' presentations helped delineate their current laboratory status, outline their assets, deficiencies, opportunities to improve, and potential threats (aka, SWOT analysis).<sup>16</sup> This approach served not only as a self-assessment but additionally to highlight common problems among the centers (Table 2), encourage collaboration, and stimulate interaction among the AHOPCA-Path members. We believe establishing a strong regional network is an essential step toward improving the overall quality of the pathology service provided in this region, which will positively affect treatment and outcome of children with cancer.

**Figure 2.** *Parallel comparison of original immunohisto chemistry slides from laboratories in five countries and slides stained during the workshop. Row 1: T-lymphoblastic lymphoma (sample from Costa Rica) showing similar excellent results, diffuse positivity for CD3 and negative for CD20, between original slides and slides stained during workshop. No background staining is noted. Row 2: Slides of lymphoid hyperplasia (sample from Santiago, Dominican Republic) were originally stained using an automated slide stainer and by hand*



during the workshop. These show comparable results with positivity for CD3 in the para-follicular region and CD20 immunoreactivity in the germinal centers. Row 3: Burkitt lymphoma (sample from Guatemala). Both original slides stained by hand (CD3 and CD20) show false-negative results. The same sample, when stained during the workshop, shows diffuse positivity for CD20 while negative for CD3, but with good internal control. Row 4: Burkitt lymphoma (sample from Honduras). The slide, originally stained by hand, shows only faint background staining. The same sample restained during the workshop after appropriate antigen retrieval shows proper diffuse positivity for CD20 and is negative for CD3 (with adequate positive internal control). Row 5: This Burkitt lymphoma sample slide (from Panama) displays diffuse positivity for CD20 and nonreactivity for CD3. A comparison between the original slides (stained using an automated slide stainer) and the slides stained by hand during the workshop show equivalent results. Magnification,  $\times 400$

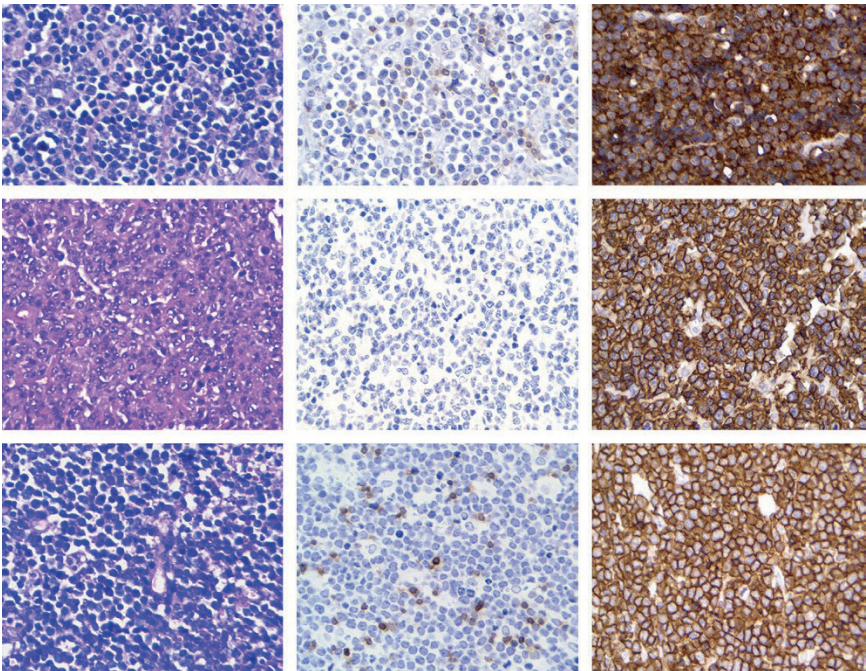


# The training course

## Training Center

The Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNNBB) in San Salvador, El Salvador, was strategically selected as the regional training center, and all the practice and didactic sessions occurred at HNNBB's Department of Pathology.

**Figure 3.** Micrographs from three cases of Burkitt lymphoma. H&E-stained slides reveal suboptimal tissue fixation. All the immunohistochemistry slides were stained manually during the workshop by histotechnologists without previous experience, and they show adequate results. All three cases were immunoreactive for CD20 and negative for CD3. (Row 1, sample from Santo Domingo; row 2, sample from Mirebalais, Haiti; row 3, sample from Nicaragua). H&E, hematoxylin and eosin. Magnification,  $\times 400$ .



The HNNBB is a public, governmental, general pediatric hospital with 450 hospital beds. The Department of Pathology is institutional and is located within the main hospital. The pathology staff comprises three senior pathologists, four histotechnologists (two of them trained in IHC), four pathology assistants, and one administrative assistant. The laboratory was recently renovated, operates in a space of 250 m<sup>2</sup>, and is well equipped. The available equipment includes an automated tissue processor, a tissue embedding center, microtomes, a tissue water bath, an incubator, microscopes (including double headed), fume hoods, a cryostat, autopsy tables, a turbo mixer, micropipettes, and precision and analytical balances. At HNNBB, the IHC assay is performed by hand, on demand, and, based on a previous assessment, it demonstrates an excellent overall quality (Fig 1).

## **Participants and Training Team**

A total of 16 participants from Costa Rica, the Dominican Republic (Santiago and Santo Domingo), Guatemala, Haiti, Honduras, Nicaragua, and Panama attended this training workshop. Two members from each program (one pathologist and one histotechnologist) were invited. Some of the participants have experience in performing IHC by hand or have used automated IHC machines in their laboratories. Nevertheless, members from three centers (ie, Nicaragua, Haiti, and Santo Domingo in Dominican Republic) had never performed or used IHC in their daily practices. The training team was composed of two histotechnologists and one pathologist from HNNBB (A.C.P.) and a pathologist from SJCRH (T.S.).

## **Didactic and Practice Activities**

An overview of IHC concepts, including antigen-antibody reaction, specificity, control samples, antibody selection, and antibody optimization and validation was given during the educational sessions. There are many advantages to using an automated IHC over manual IHC staining; in particular, the fact that it can facilitate standardization and decrease the number of histotechnologists needed. Nevertheless, the high cost of acquiring and maintaining an automa-

ted IHC staining machine can be impracticable for many AP laboratories in LMICs. Therefore, our goal was to identify a center that had a well-established, high-quality, manual IHC assay that could be replicated in other centers where automated IHC staining could not be implemented. The practice sessions during the workshop for manual IHC staining followed the techniques currently in use at HNNBB (Table 3). Methods for proper tissue fixation, tissue processing, and appropriate tissue sectioning also were reviewed during the hands-on activities. Strategies for IHC implementation, budgeting, supplies acquisition, tactics of cost reduction, and troubleshooting of the IHC assay were discussed.

The workshop participants were asked to bring three paraffin blocks from three different cases of non-Hodgkin lymphoma that had been fixed and processed at their local institutions, as well as the corresponding H&E-stained slides and prestained IHC slides (if available). This material was deidentified and used during the practice sections. Pretreatment using a heat-induced epitope retrieval technique was performed, and slides were immunostained using commercially available antibodies. Anti-CD3 (Novocastra Catalog CD3-565-L-CE), anti-CD20 (Novocastra Catalog CD20-L26-L-CE), and anti-terminal deoxynucleotidyl transferase (Novocastra Catalog TdT-339-L-CE) had been previously selected for use during this workshop. The slides prepared during the workshop were compared with the original H&E-stained and IHC slides (if available) that had been prepared at their local institution using the same paraffin blocks.

All the slides stained during the workshop as well as the original slides were reviewed during the assessment sessions by the training team and the attendees using a microscope camera connected to a screen. In selected situations, individualized review (ie, an instructor with a trainee) took place to assess any discordant or suboptimal results. General and personalized recommendations were presented to the participants. All the participants (ie, pathologists and histotechnologists) had the opportunity to perform the manual IHC assay, and some participants had the chance to repeat the reactions up to



three times. Aspects of IHC interpretation, reporting, quality-control plan, and competence assessment were also emphasized during the workshop. All the activities (didactic and hands-on) were offered in Spanish. Handouts, copies of protocols, and pictures of the slides were provided to the participants.

## Slide Review

The evaluation of the H&E-stained slides enabled identification of problems with tissue fixation and/or with processing of the specimens. Four of the 10 centers (40%) did not routinely use 10% neutral buffered formalin nor did they monitor pH or fixation time before the workshop. IHC assays were already in use in six centers (including the training center): two of them use an automated IHC staining technique (Santiago in Dominican Republic, and Panama) and four centers perform IHC by hand (Costa Rica, Guatemala, Honduras, and El Salvador). Poor antigen retrieval, nonspecific staining, and intense background staining were examples of problems identified in some of the original IHC slides. During the workshop, all the slides were stained by hand, and the results were similar to the slides stained with an automated IHC stainer. A parallel comparison of the original slides and slides stained during the workshop is presented in Figs 2 and 3.

## Summary

Based on the assessment of the participants' performance during the workshop, the evaluation of their original slides, and the slides prepared during the training sessions, we believe this model of intensive 5-day training with a combination of didactic and practice activities appears to be a useful strategy to improve IHC capacity in countries with limited resources. Nevertheless, the effect of this training workshop will need to be evaluated with short- and long-term follow-up evaluations to appraise any postworkshop changes and progress. We also believe promoting regular communication and collaboration among the participants is critical to allow regional development.

In summary, this 5-day workshop showed that a high-quality IHC assay performed by hand in a limited resource setting is achievable. When well controlled, the results of IHC assay done by hand can be reproducible and the overall performance similar to the staining obtained with an automated IHC stainer. Inadequate tissue fixation and processing, which can compromise the tissue sample interpretation and final diagnosis were identified in some participant laboratories. Strategies to improve tissue fixation and processing were addressed during the training sessions. Proper documentation, standardization, and quality-control activities were nonexistent in the vast majority of the participating institutions. The implementation and daily use of appropriate standards and procedures, and quality monitors can ensure high-quality results and reproducibility of the IHC assay in areas with limited resources. Moreover, we believe this model of training can be replicated in other LMICs.

### **Author contributions**

**Conception and design:** Teresa Santiago, Ana Concepción Polanco, Carlos Rodriguez-Galindo

**Financial support:** Carlos Rodriguez-Galindo

**Provision of study material or patients:** Ana Concepción Polanco, Lisa Miranda, Belkis Gomero, Elizabeth Orellana, Fabienne Anglade, Eduviges Ruiz, Mázlova Luxely Toledo González

**Collection and assembly of data:** Teresa Santiago, Ana Concepción Polanco, Lisa Miranda, Belkis Gomero, Elizabeth Orellana, Fabienne Anglade, Eduviges Ruiz, Mázlova Luxely Toledo González, Moisés Espino-Duran  
**Manuscript writing:** All authors

**Final approval of manuscript:** All authors

**Accountable for all aspects of the work:** All authors

**Authors' disclosures of potential conflicts of interest**

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to [www.asco.org/rwc](http://www.asco.org/rwc) or [ascopubs.org/jco/site/ifc](http://ascopubs.org/jco/site/ifc).

**Teresa Santiago**

No relationship to disclose

**Caleb Hayes**

No relationship to disclose

**Ana Concepción Polanco**

No relationship to disclose

**Lisa Miranda**

No relationship to disclose

**Argelia Aybar**

No relationship to disclose

**Belkis Gomero**

No relationship to disclose

**Elizabeth Orellana**

No relationship to disclose

**Fabienne Anglade**

No relationship to disclose

**Mázlova Luxely Toledo González**

No relationship to disclose

**Eduviges Ruiz**

No relationship to disclose

**Moisés Espino-Durán**

No relationship to disclose

**Carlos Rodríguez-Galindo**

**Honoraria:** Novimmune

**Monika L. Metzger**

**Research Funding:** Seattle Genetics

Acknowledgment

We thank the members of the Pathology Department, Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, especially Nelson Ernesto Polio Chicas and Elizabeth Hernandez.

## Affiliations

Teresa Santiago, Caleb Hayes, Carlos Rodríguez-Galindo, and Monika L. Metzger, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN; Ana Concepción Polanco, Hospital Nacional de Niños Benja-

mín Bloom, San Salvador, El Salvador; Lisa Miranda, Hospital Nacional de Niños “Dr. Carlos Sáenz Herrera,” San José, Costa Rica; Argelia Aybar, MediPath, Santiago City; Belkis Gomero, Hospital Infantil Dr. Robert Reid Cabral, Santo Domingo, Dominican Republic; Elizabeth Orellana, Francisco Marroquín Medical School, Guatemala City, Guatemala; Fabienne Anglade, Laboratory Regional Stephen at Pilar Robert, Mirebelais, Haiti; Mázlova Luxely Toledo González, Hospital Escuela-Universitario, Tegucigalpa, Honduras; Eduviges Ruiz, Hospital Infantil Manuel de Jesus Rivera “La Mascota,” Managua, Nicaragua; Moisés Espino- Durán, Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel, Panama City, Panama.

## **Support**

Supported in part by American Lebanese Syrian Associated Charities and National Institutes of Health Grant No. 3P30CA021765-37S2. Additional support for travel, accommodations, and expenses for all the workshop participants was provided by the Department of Global Pediatric Medicine, St Jude Children’s Research Hospital.

## **References**

1. Parham DM: Immunohistochemical markers of soft tissue tumors: Pathologic diagnosis, genetic contributions, and therapeutic options. *Anal Chem Insights* 10:1-10, 2015 (Suppl 1)
2. Sebire NJ, Gibson S, Rampling D, et al: Immunohistochemical findings in embryonal small round cell tumors with molecular diagnostic confirmation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:1-5, 2005
3. Sala A, Antillon F, Pencharz P, et al: Nutritional status in children with cancer: A report from the AHOPCA Workshop held in Guatemala City, August 31-September 5, 2004. *Pediatr Blood Cancer* 45:230-236, 2005



4. Howard SC, Marinoni M, Castillo L, et al: Improving outcomes for children with cancer in low- income countries in Latin America: A report on the recent meetings of the Monza International School of Pediatric Hematology/Oncology (MISPHO)-Part I. *Pediatr Blood Cancer* 48:364-369, 2007
5. Antillon F, de Maselli T, Garcia T, et al: Nutritional status of children during treatment for acute lymphoblastic leukemia in the Central American Pediatric Hematology Oncology Association (AHOPCA): Preliminary data from Guatemala. *Pediatr Blood Cancer* 50:502-505, discussion 517, 2008 (suppl 2)
6. Sala A, Rossi E, Antillon F: Nutritional status at diagnosis in children and adolescents with cancer in the Asociacion de Hemato-Oncologia Pediatrica de Centro America (AHOPCA) countries: Preliminary results from Guatemala. *Pediatr Blood Cancer* 50:499-501, discussion 517, 2008 (suppl 2)
7. Sala A, Rossi E, Antillon F, et al: Nutritional status at diagnosis is related to clinical outcomes in children and adolescents with cancer: A perspective from Central America. *Eur J Cancer* 48:243- 252, 2012
8. Luna-Fineman S, Barnoya M, Bonilla M, et al: Retinoblastoma in Central America: Report from the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA). *Pediatr Blood Cancer* 58:545-550, 2012
9. Friedrich P, Ortiz R, Strait K, et al: Pediatric sarcoma in Central America: Outcomes, challenges, and plans for improvement. *Cancer* 119:871-879, 2013
10. Friedrich P, Ortiz R, Fuentes S, et al: Barriers to effective treatment of pediatric solid tumors in middle-income countries: Can we make sense of the spectrum of nonbiologic factors that influence outcomes? *Cancer* 120:112-125, 2014

11. Castellanos EM, Barrantes JC, Báez LF, et al: A chemotherapy only therapeutic approach to pediatric Hodgkin lymphoma: AHOPCA LH 1999. *Pediatr Blood Cancer* 61:997-1002, 2014
12. Navarrete M, Rossi E, Brivio E, et al: Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in Central America: A lower-middle income countries experience. *Pediatr Blood Cancer* 61:803- 809, 2014
13. Barr RD, Antillón Klusmann F, Baez F, et al: Asociación de Hemato-Oncología Pediátrica de Centro América (AHOPCA): A model for sustainable development in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer* 61:345-354, 2014
14. Ceppi F, Ortiz R, Antillón F, et al: Anaplastic large cell lymphoma in Central America: A report from the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA). *Pediatr Blood Cancer* 63:78-82, 2016
15. Santiago TC, Jenkins JJ: Histopathologic diagnosis of pediatric neoplasms: A review of international consultations. *Arch Pathol Lab Med* 137:1648-1653, 2013
16. Casebeer A: Application of SWOT analysis. *Br J Hosp Med* 49:430-431, 1993

**Instituto de medicina tropical “Pedro Kourí”, la Habana, Cuba  
Hospital Nacional de Niños “Benjamín Bloom”, San Salvador,  
El Salvador, Centroamérica**

## ¿Por qué y cómo mueren los niños con dengue?

Dr. Eric Martínez Torres<sup>1</sup>

Dra. Ana Concepción Polanco Anaya<sup>2</sup>

Dr. Ernesto Benjamín Pleites Sandoval<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doctor en Ciencias. Especialista en Pediatría. Investigador Titular. Profesor Titular Consultante. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), La Habana, Cuba. <sup>2</sup>Especialista en Anatomía Patológica. Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNNBB), San Salvador, El Salvador, Centroamérica.

<sup>3</sup>Especialista en Infectología Pediátrica. Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNNBB), San Salvador, El Salvador, Centroamérica.

<http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v60n1/mtr06108.pdf>

### Resumen

**Introducción:** es importante conocer el modo en que agravan y fallecen los pacientes con dengue para diseñar las estrategias en la prevención de su mortalidad. **OBJETIVO:** identificar las condiciones (complicaciones y otras situaciones clínicas) a las cuales estuvo asociada la muerte, así como el tipo de afectación particular que mostraron algunos órganos.

**Métodos:** se hizo un estudio clínico-patológico de 30 niños fallecidos por dengue en El Salvador, entre 1999 y 2000. Todos los casos cumplieron los criterios clínico-humorales que establece la Organización Mundial de la Salud para ser considerados fiebre hemorrágica dengue/síndrome de choque por dengue. Mediante el análisis de la evolución diaria y horaria de cada caso, el colectivo de investigadores identificó la condición clínica o clínico-humoral a la cual estuvo asociado el fallecimiento. Se estudiaron las autopsias de 8 casos confirmados por serología o mediante inmunohistoquímica.

**Resultados:** en 20 de los 24 casos (83 %) que fallecieron durante los primeros 3 d del ingreso hospitalario, la condición asociada a la muerte fue el choque hipovolémico, a veces asociado a hemorragias, coagulación intravascular diseminada, síndrome de dificultad respiratoria por edema pulmonar no cardiogénico y daño múltiple de órganos, que fueron complicaciones del choque recurrente más que complicaciones del dengue. La coinfección bacteriana fue la condición más frecuente asociada a la muerte por dengue en los niños que fallecieron después del tercer día de hospitalización. Mediante autopsia se apreció afectación importante de hígado, corazón y riñones de estos enfermos.

**Conclusión:** la muerte por dengue es evitable en buena medida si se hace prevención del choque o se le trata de manera precoz y energicamente, con soluciones cristaloides por vía intravenosa a partir de la identificación de los signos de alarma que anuncian el inicio del deterioro clínico del enfermo con dengue.

**Palabras clave:** Dengue, dengue hemorrágico, choque, signos de alarma.

## Abstract

**Introduction:** It is important to find out how the patients with dengue become critical and die, with a view to designing the mortality prevention strategies.

**Objective:** to identify the death- associated conditions (complications and other clinical situations) as well as the specific type of damage observed in some body organs.

**Methods:** A clinical-pathological study of 30 dead children with dengue in El Salvador was performed from 1999 to 2000. All the cases met the WHO clinical and humoral criteria for being classified as either dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome. Through the analysis of daily and hourly evolution of each case, the research team identified the clinical or the clinical-humoral condition that was associated to the death of a patient. The autopsies of 8 serology- or immunohistochemistry-confirmed cases were studied.

**Results:** In 20 (83 %) of 24 cases that died in the first three days of admission, the associated condition was hypovolemic shock, sometimes related to hemorrhage, disseminated intravascular coagulation, respiratory distress caused by non-cardiogenic pulmonary edema and multiple organ damage, all of which were recurrent shock complications rather than dengue complications. The bacterial co-infection was the most frequent condition associated to death of children with dengue after the third day of hospitalization. The autopsies showed considerable damage of liver, heart and kidneys.

**Conclusion:** Death from dengue is generally preventable if hypovolemic shock is either prevented or treated timely and energetically using intravenously administered crystalloid preparations at the time of detecting alarming signs that would indicate the onset of clinical deterioration of the patient with dengue.

**Key words:** Dengue, hemorrhagic dengue, shock, alarming signs.

## Introducción

La infección por dengue puede ser inaparente desde el punto de vista clínico y puede causar una enfermedad de variada intensidad, que incluye desde formas febriles con dolores en el cuerpo y mayor o menor afectación del organismo, hasta cuadros graves de choque y grandes hemorragias.<sup>1</sup> Hasta ahora se ha aceptado que la diferencia principal entre la fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica de dengue (FHD) no son los sangramientos sino la extravasación de plasma que sea clínicamente importante.<sup>2</sup>

El espectro clínico del dengue tan variado explica la diversidad de cuadros clínicos que se pueden encontrar en una misma familia o población durante un brote epidémico, pues algunos pacientes (quizás la mayoría) estarán solo ligeramente afectados y ni siquiera procurarán los servicios médicos, otros serán oligosintomáticos y otros estarán muy afectados, con gran postración y quizás con una

evolución desfavorable, deterioro clínico y muerte, a veces en pocas horas. Cada uno de los 4 virus del dengue puede producir cualquier cuadro clínico del referido espectro.

También existen las llamadas formas “atípicas”<sup>3</sup> o formas clínicas con especial afectación de un órgano o sistema, las cuales<sup>4</sup> han sido hasta ahora infrecuentes, a saber: encefalopatía, miocardiopatía o hepatopatía por dengue, así como la afectación renal conducente a insuficiencia renal aguda, y otras,<sup>5,6</sup> que también pueden asociarse a mortalidad. Estas formas clínicas de aparente rareza o “atipicidad” no debieran sorprender, si se recuerda que los virus del dengue pertenecen a la misma familia Flaviviridae (todos arbovirus) entre los que se encuentran los que producen la encefalitis de San Luis y la encefalitis japonesa, así como la fiebre amarilla, cuya expresión clínica es muy intensa en el encéfalo o el hígado, respectivamente.<sup>3,4</sup>

En los años 1999-2000 la República de El Salvador, en Centroamérica, sufrió su primera gran epidemia de fiebre hemorrágica dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD), la cual fue producida por una cepa muy patógena de origen asiático del virus dengue serotipo 2 (DEN-2), al circular en una población que 5 años antes había tenido epidemia por DEN-3 y la circulación endémica de DEN-1 y DEN-4.

Durante los últimos meses de 1999 se produjo el primer incremento del número de casos que declinó al comienzo de 2000 para reiniciar el aumento sostenido del número de notificaciones a partir de marzo de ese año hasta totalizar 18 433 enfermos (en noviembre/2000) para una tasa de  $50,3 \times 100\,000$  habitantes, de los cuales 355 (12 %) fueron casos de FHD y 36 fueron considerados inicialmente como fallecidos por esta enfermedad, en la edad pediátrica.<sup>7</sup>

Es importante conocer el modo en que agravan y fallecen los pacientes para mejorar el diseño de las estrategias en la prevención de la mortalidad por esta enfermedad (que no tiene hasta ahora una vacuna ni un medicamento antiviral de reconocida eficacia) así como el perfeccionamiento del manejo clínico de casos severos mediante

la identificación precoz de signos clínicos y de laboratorio, que señalen el inicio del deterioro del estado del paciente para proceder a la reposición energética de líquidos por vía intravenosa y otras medidas terapéuticas capaces de impedir su evolución fatal.

El objetivo del presente estudio ha sido identificar las condiciones (complicaciones y otras situaciones clínicas) a las cuales estuvo asociada la muerte, así como el tipo de afectación particular que mostraron algunos órganos (hígado, pulmón, corazón, riñón) de estos niños fallecidos durante la referida epidemia salvadoreña.

## **Métodos**

Se estudiaron los expedientes clínicos y toda la información serológica y epidemiológica de 36 pacientes que habían fallecido con diagnóstico probable de dengue en el Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNNBB) de San Salvador, El Salvador, durante el período de octubre de 1999 y todo 2000, así como los protocolos de autopsia de aquellos casos a los cuales sus familiares autorizaron este proceder. Se excluyeron 6 casos por no cumplir los criterios de dengue.

El estudio se realizó, por tanto, en 30 casos fallecidos con las características siguientes: edad comprendida entre 5 meses y 6 años y relación masculino: femenino no significativa (16:14). Todos los casos cumplieron los criterios clínico- humorales que establece la Organización Mundial de la Salud (OMS) para ser considerado FHD/ / SCD.2 En 19 casos el diagnóstico de dengue se confirmó por estudio serológico o mediante inmunohistoquímica y en los 11 casos restantes, el diagnóstico se hizo aplicando el criterio clínicoepimiológico, después de haberse excluido otras causas infecciosas.

Mediante el análisis de la evolución diaria y horaria de cada caso, el colectivo de investigadores identificó la condición clínica o clínico-humoral a la cual estuvo asociado el fallecimiento, a saber: choque, hemorragias, coagulación intravascular diseminada (CID),

fallo múltiple de órganos, síndrome de dificultad (distrés) respiratorio por edema pulmonar no cardiogénico, así como la afectación particular de un órgano (hígado, encéfalo, corazón, riñón) y la posible coinfección bacteriana o por otro agente biológico. Se trató siempre de determinar una sola condición asociada al fallecimiento, lo cual se logró hacer en 22 casos, aunque en 5 casos hubo que admitir 2 de estas condiciones (choque y hemorragias, con CID o sin esta, choque y síndrome de dificultad respiratoria) y en otros 3 casos se asociaron 3 de tales condiciones (algunas de las referidas más fallo múltiple de órganos o coinfección).

Se estudiaron las autopsias de 10 casos sospechosos de dengue, de los cuales 8 tuvieron confirmación de esta infección (por serología o inmunohistoquímica): en 7 casos la autopsia fue parcial y completa en el caso restante.

## **Resultados**

De los 30 casos estudiados, 24 fallecieron a las 0-72 h de hospitalización y más de la mitad (21 casos) había llegado referido al Hospital procedente de otros hospitales del país. Todos habían presentado fiebre y dolores corporales antes del ingreso, manifestaciones digestivas (vómitos, dolor abdominal, diarreas) en proporción e intensidad variables, así como exantema y algún sangrado referido en la mitad de los casos. Los demás pacientes también presentaron alguna hemorragia durante el período de hospitalización. El día de ingreso en el hospital terminal osciló entre el tercero y el quinto a partir de haberse iniciado la fiebre y el fallecimiento ocurrió entre el cuarto y octavo días en 80 % de los casos.

En 20 de los 24 casos (83 %) que fallecieron durante los primeros 3 d del ingreso hospitalario, la condición asociada a la muerte fue el choque hipovolémico. En 8 ocasiones el choque se asoció a síndrome de dificultad respiratoria (expresión de edema pulmonar no cardiogénico), lo cual ocurrió siempre cuando el paciente ya había estado 24 o 48 h sin restablecerse del choque recurrente característico de



esta enfermedad. Un paciente desarrolló, además, coinfección bacteriana (neumonía suficientemente extensa como para considerarse condición codeterminante del fallecimiento). También en este grupo se identificaron otras condiciones asociadas al choque: hemorragias masivas (con CID asociada o sin esta) en 7 casos (uno durante el segundo día de hospitalización y 6 durante el tercer día).

En ese período inicial de hospitalización (0-72 h) también fallecieron 4 casos en los cuales la hemorragia fue considerada como la condición más importante asociada al fallecimiento (siempre en estos casos el fallecimiento ocurrió en las primeras 48 h), pues previamente no se habían identificado signos de choque. Es de señalar que todos fueron pacientes que habían sido referidos de otras instituciones hospitalarias del país, 2 de estos 4 fallecidos tuvieron evidencias de CID.

Cuando el fallecimiento ocurrió después de 72 h de hospitalización, la condición más frecuente asociada a la muerte fue la coinfección (4 casos) con el foco de infección pulmonar en 3 ocasiones (neumonía con derrame o sin este) y meningoencefalitis purulenta en el caso restante, sin haberse podido identificar el agente biológico causal. El paciente evolucionó desfavorablemente y murió por las complicaciones propias de este tipo de infección del sistema nervioso central (SNC). Otro paciente falleció varios días después de su hospitalización por presentar un cuadro clínico de fiebre con afectación de la conciencia y disfunción renal, así como un líquido cefalorraquídeo (LCR) claro y transparente cuyo estudio citoquímico mostró algunos linfocitos, glucorraquia normal y ausencia de proteinorraquia. La IgM específica de dengue fue positiva en suero, no se realizó autopsia ni se estudió dengue en LCR (tabla 1).

**Tabla 1.** Niños fallecidos por FHD/SCD en El Salvador, 2000, según condición asociada al fallecimiento y días de hospitalización

Condición	Días de hospitalización				
	1	2	3	4	5 o más
Choque	7	6	6		
Distrés respiratorio		2	6		
Hemorragias	1	3	6		
Coagulación intravascular Diseminada	1	2	2		
Fallo múltiple de órganos					1
Coinfección			1	1	3
Disfunción renal y afectación del SNC					1

En todos los casos de autopsia, al examen macroscópico se apreció ascitis y derrame pleural, así como discreto derrame pericárdico en 5 casos. Los pulmones siempre tuvieron aspecto hemorrágico, el hígado fue blando y de color amarillento y la mitad de las veces se apreció hemorragia de la cápsula hepática. El bazo siempre estuvo aumentado de tamaño por congestión y tuvo consistencia blanda. Todos los órganos estudiados mostraron edema e hiperemia.

Los estudios microscópicos de hígado (tabla 2) evidenciaron en todos los casos menos uno, necrosis en el área mediozonal y hemorragia, así como algún signo de inflamación (siempre por células mononucleares excepto un caso que presentó reacción inflamatoria con predominio de eosinófilos). Casi todos los casos mostraron signos de necrosis y apoptosis, así como de esteatosis (metamorfosis grasa) y trombos de fibrina. Debe destacarse que los enfermos que mostraron mayor intensidad en las alteraciones morfológicas referidas fueron los que habían alcanzado en vida los valores más elevados en los estudios de enzimas en sangre (transaminasas), hasta más de 1 000 unidades.

El edema y las hemorragias fueron muy significativos en las imágenes microscópicas de los pulmones (tabla 3). Se apreciaron, además, membranas hialinas en 4 casos y algunos trombos de fibrina.

En 2 casos, el corazón mostró signos de miocarditis, severa en un caso y moderada en el otro. Los hallazgos en corazón, hígado y riñón

de un tercer caso eran compatibles con los del síndrome de Reye. Este paciente había recibido aspirina durante la etapa febril de su enfermedad y tuvo taquicardia y afectación de la conciencia durante su hospitalización.

**Tabla 2.** Hallazgos microscópicos hepáticos y valor de transaminasas en niños fallecidos por fiebre hemorrágica dengue, El Salvador, 2000

Casos	1	2	3	4	5	6
Apoptosis	+++	+	+	++	-	+
Necrosis	+++	+	+	+++	-	+
Inflamación	+++	++	++	++	-	-
Esteatosis	+++	+	+++	+++	-	+
Edema	+++	++	+++	+++	-	+
Hiperemia		++	+++	+++	+	+
Hemorragias	+++	++	+++	+++	+	+
Trombos de fibrina	+	-	++	+	+	+
Valor de Transaminasas	+++	NST	NST	++	NST	++

+: leve, ++: moderada, +++: severa. NST: no se tomó valor.  
Valor de transaminasas= +: menor que 100, ++: mayor que 100, +++: mayor que 1 000.  
Fuente: Protocolos de autopsias 2000, HNNBB.

**Tabla 3.** Hallazgos microscópicos cardiopulmonares en niños fallecidos por fiebre hemorrágica dengue. El Salvador, 2000

Casos							
En pulmones:	1	2	5	6	7	8	10
Edema	+++	+++	+	++	+++	+	++
Infarto	+++	+++	+	++	+++	+	++
Hemorragia	+++	+++	+	+	+++	+	++
Trombos de fibrina	++	-	+	-	+	-	++
Membranas hialinas	++	-	+	-	+++	-	+++
En corazón: Miocarditis	NSA	NSA	-	+++	+++	Tipo Reye	-

+: leve, ++: moderado, +++: severo, NSA: no se realizó autopsia tipo Reye: miocardio con infiltración grasa difusa tipo Reye miocarditis: mononucleares linfocitos como infiltrado predominante. Fuente: Protocolos de autopsias 2000, HNNBB

Los riñones (tabla 4) presentaron lesiones hemorrágicas y signos de glomerulonefritis, tubulitis y necrosis tubular aguda de alguna intensidad en todos los casos con autopsia realizada. En 3 casos pudo apreciarse apoptosis en las células epiteliales del túbulo proximal.

**Tabla 4.** Hallazgos microscópicos renales en niños fallecidos por fiebre hemorrágica dengue, El Salvador 2000

Casos	1	2	10
Glomerulonefritis	+++	+++	++
Tubulitis	+++	+++	+
Necrosis tubular aguda	+++	+++	+
Nefritis	+	++	+
Microtrombos de fibrina	+	+	-
Apoptosis de células epiteliales tubulares	+	++	-
Calcificaciones	++	++	+
Edema	+++	+++	++
Hiperemia	+++	+++	++
Hemorragia	+++	+++	++

+: leve, ++: moderado, +++: severo.  
Fuente: Protocolos de autopsias 2000, HNNBB.

Discusión

Choque y edema pulmonar

El choque fue, sin dudas, la condición que con mayor frecuencia se asoció al fallecimiento por dengue, sobre todo en los pacientes que murieron durante las primeras horas (0-72) de hospitalización. El choque puede ser causa directa y única de muerte pues constituye un estado de bancarrota sistémica y también puede inducir otras complicaciones, como son las grandes hemorragias, con CID o sin esta, así como fallo múltiple de órganos debido al síndrome de hipoperfusión/reperfusión con diversas alteraciones funcionales que se superponen y determinan de conjunto el fallecimiento del enfermo.

En el dengue, el choque es primariamente hipovolémico por la extravasación masiva de plasma que se produce a través de los endotelios debido a varios mecanismos fisiopatológicos. El choque por dengue, de manera usual se presenta de forma súbita, intensa y transitoria, por lo cual su causa pudiera ser el escape de plasma determinado por el derrame de citoquinas proinflamatorias (TNF alfa, IL-1, IL-8, IL-10) y otros mediadores como la selectina E y el ICAM-1, así como la lisis de las células endoteliales por apoptosis a partir de la acción propia de citoquinas.<sup>8</sup> La acción de anafilatoxinas resultantes de la activación del complemento pudiera también contribuir al choque.<sup>4</sup>

Los mismos mecanismos fisiopatológicos que conducen al choque por dengue son capaces de producir el edema pulmonar no cardiogénico, el cual se expresa clínicamente como un síndrome de dificultad respiratoria que lleva al paciente a morir “ahogado en sus propias secreciones”. Es significativo que el llamado síndrome de dificultad respiratoria del adulto, tanto en adultos como en niños en este caso, se presenta siempre en los enfermos de dengue después del choque prolongado o recurrente. El aporte exagerado de líquidos durante la etapa de choque recurrente, que puede demorar 24 h o más, constituye un factor contribuyente de importancia, sobre todo si se han utilizado coloides en el intento de resucitación. La evidencia cada vez más frecuente de afectación miocárdica en estos enfermos obliga a tener en cuenta la posibilidad de un cuadro de bajo gasto cardíaco que coexiste con los mecanismos previamente referidos.

## **Hemorragias y cid**

En las infecciones por dengue se produce la activación del sistema de coagulación a partir, primariamente, de la vía intrínseca –que resulta la más afectada- lo cual se evidencia en estudios avanzados de la enfermedad. También la vía del factor tisular se activa de manera continuada en los estadios avanzados de la infección por dengue. En el dengue existe, además, un estado fibrinolítico discretamente acelerado, en el cual los productos de la degradación de la fibrina no están tan elevados como en la CID asociada a infección bacteriana.

Las concentraciones del dímero D han estado elevadas, pero no se han asociado a la evolución desfavorable de los enfermos.<sup>9</sup>

¿Son estos trastornos de la coagulación/fibrinólisis los que determinan la muerte de los enfermos? No se ha podido responder esta pregunta, porque los expertos consideran que los estudios disponibles fueron realizados casi todos en los años de la década 1970-80 y han sido escasos, inconsistentes y con sesgos. Así, se ha identificado información defectuosa de la selección de casos y controles, sin poderse establecer claramente si los casos incorporados al estudio estaban en un estadio similar de la enfermedad y si las medidas de sostén habían sido ya aplicadas. Además, la hospitalización demorada pudo haber sido un factor importante, la dificultad en precisar si la alteración hematológica fue el resultado directo de la acción del virus dengue o el resultado de otros factores (citoquinas) que son capaces de influir a la vez en la evolución del enfermo y en la activación de la coagulación, de manera independiente.<sup>9</sup>

El endotelio normal produce inhibidores de la coagulación, como son la trombomodulina, el heparan sulfato y los activadores del plasminógeno. Estas propiedades antitrombogénicas se pierden cuando las células endoteliales son estimuladas por los microorganismos causales (¿también por los virus del dengue?), algunos mediadores (citoquinas), o ambos. Las células endoteliales cumplen una función crucial en la regulación de la hemostasia. La infección por dengue induce la secreción del activador del plasminógeno tisular (tPA) pero no del inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) in vitro. La interleuquina 6 (Il-6) es capaz de regular la producción de tPA inducida por los virus del dengue al nivel de endotelios.<sup>10</sup>

## **Coinfección y afectación del aparato inmunológico**

A partir del cuarto día de hospitalización, la principal condición asociada al fallecimiento de niños con dengue fue la coinfección bacteriana, con neumonía demostrada o sin esta. Todos esos enfermos estuvieron sometidos a elevados riesgos de adquirir infección como son las múltiples venipunturas, múltiples accesos venosos, venti-

lación mecánica y demás maniobras invasivas que con frecuencia se aplican en las Unidades de Cuidados Intensivos. No obstante, la condición favorecedora de infección sobreañadida a estos enfermos graves probablemente haya sido el daño a linfocitos T y órganos linfoides que son inducidos por los virus del dengue y conducen a una afectación transitoria de la inmunidad celular.

### **Afectación particular de órganos**

Un caso de esta serie mostró un cuadro febril abigarrado en el cual predominaba la afectación de la conciencia sin signos de focalización, líquido cefalorraquídeo claro y transparente con escasa celularidad, franco predominio linfocitario y muerte inesperada. No se le realizó autopsia, pero el estudio serológico en sangre mostró IgM positiva a dengue. En 2005, durante una epidemia de DEN-3 en el estado de Rondonia, Brasil, se identificó un grupo de pacientes con manifestaciones neurológicas y diagnóstico confirmado de dengue –ninguno falleció–, y en 2006, en Río de Janeiro, a un adulto fallecido quien había presentado fiebre y coma a partir de una meningoencefalitis aguda de probable causa viral, se le confirmó DEN-3 en el LCR (Nicolai C, Dirección Municipal de Epidemiología, Río de Janeiro, comunicación personal). También con coma y convulsiones falleció una niña de 10 años en Asunción, Paraguay, durante la epidemia de 2007, con diagnóstico molecular de DEN-3 (Bellassai J, Departamento de Patología de la Universidad de Asunción, comunicación personal). El dengue es capaz también de producir daño hepático, miocárdico, pulmonar y renal, tal como quedó evidenciado en los estudios necrópsicos del presente grupo de casos fallecidos. Es difícil determinar la contribución que a la evolución fatal de cada caso hace la afectación particular de un órgano determinado. En ocasiones, se utiliza el termino “atípico” cuando existe un predominio evidente de afectación del hígado,<sup>11</sup> del miocardio<sup>12</sup> o del encéfalo.<sup>13</sup> Otras “atipicidades” asociadas al dengue también han sido descritas.<sup>5</sup> Mejor que atípicas, deben considerarse formas severas de dengue que se presentan con menor frecuencia que la FHD y síndrome de choque por dengue.

La afectación hepática por el dengue se expresa por elevación de las enzimas séricas (alanin y aspartato-aminotransferasas) que se elevan 5 veces o más por encima de sus valores normales.<sup>14</sup> Todos, excepto uno de un grupo de niños tailandeses fallecidos por dengue tuvo elevación de las transaminasas (TGP) de 68 a 4 800 U y valor promedio de 1 214 U.<sup>15</sup>

Las evidencias in vitro e in vivo sugieren que las células hepáticas sufren apoptosis en respuesta a la infección por virus dengue,<sup>16</sup> de modo semejante a lo que ocurre por la infección del virus de la fiebre amarilla, en la cual estudios recientes demuestran una prevalencia del mecanismo de apoptosis sobre la necrosis y una respuesta inflamatoria desproporcionadamente discreta.<sup>17</sup>

### **¿Es posible evitar la muerte por dengue?**

La demostración de que el choque es la más frecuente condición asociada al fallecimiento de niños con dengue coincide con los estudios realizados en niños que fallecieron durante la epidemia de DEN-2 en Cuba, en 1981. Cuando se reconstruyó la historia natural de la enfermedad que sufrieron los menores de 15 años fallecidos, se encontró que el cuarto día era el día del choque y el quinto día era el día de la muerte, mientras que casi todos los pacientes habían presentado durante el tercer día de la enfermedad vómitos frecuentes, dolor abdominal intenso y mantenido, irritabilidad o somnolencia, signos que después fueron considerados como "de alarma" por cuanto anunciaban la inminencia del choque.<sup>18</sup>

Los signos de alarma anuncian el inicio del deterioro del paciente, por lo cual deben ser tenidos en cuenta para iniciar la reposición de líquidos por vía intravenosa, de modo precoz y enérgico, utilizando soluciones cristaloides principalmente. Esta medida terapéutica puede ser salvadora. Estas orientaciones están contenidas en las Guías para la Prevención y Control del Dengue y Dengue Hemorrágico publicadas por la Organización Panamericana de la Salud en 1995,<sup>19</sup> las cuales mantienen su vigencia.<sup>20</sup>



El presente estudio destaca la importancia del choque en el desencadenamiento de la muerte por dengue, aunque exista y se demuestre la afectación de diversos aparatos y sistemas. Entonces, prevenir o tratar precoz y adecuadamente el choque puede significar evitar la muerte, por cuanto se hace prevención de otras complicaciones (grandes hemorragias, CID, fallo múltiple de órganos), que en realidad son complicaciones del choque prolongado y recurrente, más que complicaciones del dengue.

## **Referencias bibliográficas**

1. Fonseca SNS: Dengue virus infection. *Curr Opin Pediatr.* 2002; 14(01):67-71.
2. World Health Organization. Dengue Haemorrhagic Fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 1997. p. 1-84.
3. Strobel M, Lamaury I: Fievre dengue: mise au point. *Rev Med Int. (Paris)* 2001; 22(7):315-23.
4. Martínez E: Dengue y Dengue Hemorrágico. Buenos Aires:Ed Univ Quilmas; 1998. p.1-269.
5. Méndez A, González G. Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños. *Biomédica.* 2006; 26:61-70.
6. Bandyopadhyay S, Lum LCS, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue hemorrhagic fever. *Trop Med Internat Health.* 2006;2(8):1238-125.
7. Lemus Lago ER, Estévez Torres G, Velázquez Acosta JC. Campaña por la esperanza. La lucha contra el dengue. La Habana: Editora Política; 2002. p. 91-133.

8. Cardier JE, Mariño E, Romano E, Tayloir P, Liprandi F, Bosch N, Rothman AL. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF- $\alpha$  in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine* 2005; 30:359-65.
9. Mairuhu ATA, MacGuillavry MR, Setiati TE, Soemantri A, ten Cate H, Brandjes DPM, van Gorp ECM. Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence. *Lancet Infect Dis.* 2003; 2:33-41.
10. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC, Yeh TM. Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cells. *J Med Virol.* 2003;79(4):610-6.
11. Del Valle S, Piñera Martínez M, Guasch Saent-Felix F. Hepatitis reactiva por virus del dengue hemorrágico. *Rev Cubana Med Trop.* 2001; 53(1):28-31.
12. Neo HY, Wong RC, Seto KY, Yip JW, Yang H, Ling LH. Non-compaction cardiomyopathy presenting with congestive heart failure during intercurrent dengue viral illness: importance of phenotypic recognition. *Int J Cardiol.* 2006; 107(1):123-5.
13. Palma-da Cunha-Matta A, Soares-Moreno SA, Cardoso-de Almeida A, et al: Neurological complication arising from dengue virus infection. *Neurol.* 2004; 39(3):233-7.
14. Itha S, Kashvap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri C, Agarwal R. Profile of liver involvement in dengue virus infection. *Natl Med J India.* 2005; 18(3):127-30.
15. Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Eaksangsri P. Fatal cases of dengue hemorrhagic fever at Children's Hospital 1987. *Bull Dept Med Serv.* 1988; 14:771-8.

16. Thongtan T, Panyim S, Smith DR. Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B. *J Med Virol.* 2004;72(3):436-44.
17. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernández ER, Guedes F, Takakura CF, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cell activity. *Virology.* 2006;345(1):22-30.
18. Martínez E. Dengue. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2005. p. 187-190.
19. Organización Panamericana de la Salud. Guías para la Prevención y Control del Dengue y Dengue Hemorrágico, Washington DC: OPS; 1995. (Publicación Científica 548)
20. Martínez E. Prevención de la mortalidad por dengue: un espacio y un reto para la atención primaria de Salud. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2006;20(1):60-74.

# Pericarditis aguda y taponamiento cardiaco por *Haemophilus influenzae* tipo IVb en una paciente pediátrica. Comunicación de un caso de autopsia, El Salvador

Ana Concepción Polanco Anaya\*

\* Médica patóloga, Jefa del Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom. Profesora de cátedra de patología, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.

**Correspondencia:** Dra. Ana Concepción Polanco Anaya, correo electrónico: [appolanco@yahoo.com](mailto:appolanco@yahoo.com) Recibido: diciembre 2010. Aceptado: febrero, 2011.

Este artículo debe citarse como: Polanco-Anaya AC. Pericarditis aguda y taponamiento cardiaco por *Haemophilus influenzae* tipo IVb en una paciente pediátrica. Comunicación de un caso de autopsia, El Salvador. Patología Rev Latinoam 2011; 49(1):37-42.

## Resumen

Se comunica el caso de una preescolar de cuatro años de edad, quien en marzo de 2006 fue referida de urgencia al Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNNBB), en San Salvador, El Salvador; con antecedente de fiebre, cefalea, tos, disnea y dolor torácico severo. Al estudio de rayos X de tórax se observó una cardiomegalia grado IV, y luego de minutos de ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos, falleció con sospecha clínica diagnóstica de sepsis, miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca. La paciente fue sometida a estudio de autopsia en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital, en donde se encontró una pericarditis aguda abscedada que no afectaba otros órganos, pero que fue suficiente para provocar un taponamiento cardiaco y la muerte de la paciente. El cultivo efectuado reveló la bacteria *Haemophilus influenzae* tipo IVb como causante del cuadro descrito, y fue confirmada por inmunohistoquímica y PCR (exámenes realizados en el CDC de Atlanta, en tejido de autopsia enviado para tal fin). La importancia de comunicar este caso radica

en la naturaleza atípica de la presentación clínica. Se espera que las lesiones pericárdicas se encuentren asociadas casi siempre con otras enfermedades secundarias del corazón o con enfermedades en las estructuras adyacentes, o como complicación de alguna enfermedad sistémica, pero la enfermedad pericárdica aislada como tal es inusual. Asimismo, quedan en evidencia los problemas que enfrenta la atención primaria ante una enfermedad que puede ser evitada a través de la vacunación, resaltando el fallo de la medicina preventiva. Se describe y se discute el caso y se revisa la bibliografía.

**Palabras clave:** pericarditis, *Haemophilus influenzae*, cardiomegalia, taponamiento, absceso, autopsia, sepsis, PCR, inmunohistoquímica.

## Abstract

This article presents the case of a female preschool age 4, who in March 2006 was referred urgently to the National Children Hospital Benjamín Bloom (HNNBB) in San Salvador, El Salvador, with a history of fever, headache, cough, breathlessness and severe chest pain. The study of chest X-ray showed a grade IV cardiomegaly, and minutes after admission to the intensive care unit, patient died with clinical diagnosis of sepsis, dilated cardiomyopathy and heart failure. The patient underwent autopsy study in the Department of Pathology of the Hospital, where there was an acute pericarditis abscess with no affection of other organs, but that was enough to cause a cardiac tamponade and death of the patient. Culture revealed the bacteria *Haemophilus influenzae* type IVb as causing the situation described, and it was confirmed by immunohistochemistry and PCR (tests conducted at the CDC in Atlanta in autopsy tissue sent for this purpose). The importance of this case lies in the atypical nature of the clinical presentation. Pericardial injuries are frequently expected to be associated to other diseases or disorders of the heart secondary to adjacent structures, or as a complication of systemic disease. The isolated pericardial disease itself is unusual and also evidences the problems facing primary care before a disease that can be prevented through vaccination, highlighting the failure of preventive medicine. Case is described and discussed and literature is reviewed.

**Key words:** pericarditis, *Haemophilus influenzae*, cardiomegaly, tamponade, abscess, autopsy, sepsis, PCR, immunohistochemistry.

*Haemophilus influenzae* es un cocobacilo gramnegativo no móvil, facultativo, cuyas cepas se clasifican según la presencia de cápsula. Seis de ellas son encapsuladas separadas en tipos que van desde la “a” hasta la “f”.

De ellas la tipo IVb es la responsable de cerca de tres millones de enfermedades graves y de alrededor de 386,000 defunciones anuales, en su mayor parte por complicaciones como meningitis y neumonía en la población mundial. La población más vulnerable son los niños de entre 4 y 18 meses, aunque existen reportes de casos graves que ocurren en adultos de todas las edades.

En términos históricos la vacuna contra *Haemophylus influenzae* tipo b apareció en los esquemas de vacunación de países como Canadá en 1986, Bermudas en 1989 y Estados Unidos en 1991.

En países en desarrollo como El Salvador, se han efectuado diversos tipos de esfuerzos para disminuir la incidencia de casos, lo que previene la presentación de los mismos con formas graves de la enfermedad o complicaciones; esto sólo se logra a través de programas completos de inmunizaciones de la población en riesgo. El grupo técnico asesor sobre enfermedades prevenibles por vacunación de la OPS (GTA) instó desde 1997 a todas las naciones en desarrollo a incluir dicha vacuna en sus esquemas, y fue adoptada inmediatamente por países centroamericanos como Costa Rica en 1998, Honduras y Nicaragua en 1999, El Salvador en 2002 y Guatemala en 2005.

El esquema de vacunación de El Salvador tiene, además, inmunizaciones obligatorias contra difteria, tosferina, sarampión, meningitis, poliomielitis, rubéola, hepatitis B, rotavirus, paperas, tuberculosis, tétanos, toxoide tetánico para mujeres embarazadas, y recientemente la vacuna contra la influenza A H1N1.

En las estadísticas de salud pública de El Salvador, no existen reportes de esta enfermedad específica como tal, ya que los registros epidemiológicos cuantifican las neumonías y las infecciones respiratorias agudas en general y no por causa. En el Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, el cual es el único centro pediátrico de atención infantil y de referencia nacional en un país con alrededor de cinco millones de habitantes en 21,000 km<sup>2</sup>, durante los últimos años (2006-2009), en archivos de cultivos de laboratorio clínico, se reportan cerca de uno a cuatro casos al mes de pacientes con distintos cuadros de infección por la bacteria *Haemophilus influenzae* tipo IVb en estudios obtenidos de distintas regiones corporales, el caso que aquí se comunica es el único en localización pericárdica.

A continuación se comunica el caso de una paciente pediátrica que provenía de una de las áreas de extrema pobreza de El Salvador, nacida de una familia numerosa, en donde la prevención de la enfermedad a través de la vacunación no fue efectuada. El propósito de reportarlo es dar a conocer que las enfermedades infecciosas prevenibles por vacunación aún son frecuentes en la consulta diaria, lo que reafirma lo ya establecido en la bibliografía investigada: la pericarditis como enfermedad primaria es un hallazgo clínico inusual.

## **Comunicación del caso**

Se efectuó estudio de autopsia en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, en marzo de 2006. Se siguieron los protocolos internacionales para autopsias en Pediatría: se fijaron los tejidos en formaldehído amortiguado a 10%, se utilizó el procesador de tejidos Reichter Jung 2000, hasta inclusión en parafina y luego se sometieron al tren de tinción de hematoxilina eosina, y tinciones de histoquímica para técnicas de Giemsa y Gram según la rutina de procedimientos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de Estados Unidos.

Los tejidos óseos se sometieron a procedimiento estándar de fijación en formaldehído amortiguado a 10%, descalcificación con ácido nítrico y luego procesados según rutina.

Se tomaron fotografías para registro, se revisó el expediente clínico y se efectuó un resumen de los datos y los exámenes relevantes para el diagnóstico.

Los cultivos de tejidos y secreciones obtenidas en autopsia se sembraron en Agar chocolate y se usó el método manual de Kirby Bauer para obtener la sensibilidad.

El caso se envió, además, al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, el Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas, División de Enfermedades Virales y por Rickettsia, Actividad Patológica de Enfermedades Infecciosas, en donde se confirmó el diagnóstico por técnica de PCR e inmunohistoquímica.

### **Resumen clínico del caso**

Se trata de la paciente EJRD, originaria del municipio de Victoria, Departamento de Cabañas, caserío Catalino, era la última hija de 14, de los cuales sólo cinco estaban vivos. Se desconoce la edad de la madre, quien mencionó que a la paciente no se le cumplió con el esquema de vacunación por un descuido de la familia, ya que se trataba de la hija menor y además era una niña muy saludable.

El cuadro clínico presentado es agudo de cinco días de evolución de fiebre de fuerte intensidad no cuantificada, intermitente, de predominio nocturno y cefalea, ambos síntomas medicados por la madre con acetaminofen, una cucharadita cada ocho horas. Posteriormente la paciente sufrió durante cuatro días tos húmeda cianotizante y emetizante, por lo que decidió consultar con un médico particular quien indicó cefuroxima oral, mucolíticos y antitusivos. Al no presentar mejoría y al añadirse a los síntomas descritos debilidad general, disnea severa y palidez, tres días previos al ingreso, la madre decidió consultar al Hospital Nacional de Sensuntepeque, en



donde se reportaron los siguientes signos vitales: frecuencia cardíaca de 120 x min, frecuencia respiratoria de 60 x min y temperatura de 37.5 °C. Al examen físico se observó a la paciente adinámica, hipoactiva, disneica con tirajes intercostales y subdiafragmáticos, estertores basales, hepatomegalia con hígado de 6 cm bajo reborde costal derecho. Se le dio atención rápida con medidas generales y oxígeno y fue referida a la Unidad de Urgencia del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, en donde se recibió en el turno nocturno, la paciente tenía oxígeno por ambú a 3 L x min, con tendencia al sueño e irritable al intentar despertarla. Se reportaron los mismos signos vitales encontrados en el hospital periférico. Al examen físico se observó buena expansión costal, pulmones hipoventilados con estertores basales derechos, taquicardia con ritmo regular, el hígado a 7 cm bajo reborde costal derecho, pulsos arteriales disminuidos en miembros inferiores y llenado capilar menor de 2 segundos. Se le efectuó toma de rayos X de tórax (Figura 1).

**Figura 1.** Radiografía de tórax: muestra cardiomegalia globosa más infiltrado alvéolo-intersticial difuso en el lado derecho. Hay derrames pleurales bilaterales con predominio en el lado derecho



Con estos datos se diagnosticó miocardiopatía dilatada en insuficiencia cardíaca global, y fue enviada a la Unidad de Cuidados Intensivos, se le colocó catéter subclavio y se inició manejo inotrópico, la paciente fue intubada para proporcionar adecuado soporte ventilatorio. Veinte minutos posterior a su ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos, durante el examen físico el médico tratante reportó ruidos cardíacos apagados y débiles, la paciente efectuó luego un episodio de bradicardia seguida por paro cardiorrespiratorio, el cual no revirtió a maniobras de resucitación convencionales.

Los exámenes de laboratorio realizados durante su corta estancia en el Hospital reportaron: hemoglobina: 9.2 g/dL, hematócrito: 28.3%, leucocitos: 13,903 x mL, linfocitos: 60%, neutrófilos segmentados: 40%, plaquetas: 654,300 x mL; creatinina: 0.70 mg/dL, nitrógeno ureico: 19 mg/dL, sodio: 128 mEq/L, potasio: 4.32 mEq/L, cloro: 106 mEq/L, calcio: 8.6 mg/dL (normal 8.4-10.2), fósforo 5.2 mg/dL, magnesio: 2.26 mg/dL.

Se realizó estudio autopsico siguiendo los estándares ya mencionados. En el estudio macroscópico lo más destacado fue que a la apertura de la cavidad torácica se observó la salida espontánea de líquido francamente purulento proveniente de la cavidad pericárdica, aproximadamente 350 cc de líquido viscoso de aspecto pus (Figura 2), lo que provocó el cuadro de taponamiento cardíaco en la paciente, el cual fue la causa de muerte. No se observó el exudado en ninguna otra cavidad serosa, el pericardio estaba adherido a la pleura parietal del pulmón derecho, que mostraba una lesión neumónica única de aproximadamente 2.7 cm de diámetro mayor y se continuaba con engrosamiento de la cisura, pero sin comunicar con la pared pericárdica.

Los hallazgos microscópicos de la autopsia confirman los macroscópicos mostrados, además, se encontró neumonitis intersticial eosinofílica en el pulmón derecho y reacción granulomatosa a cuerpo extraño (rodeando fragmentos necróticos de parásito nematodo adulto), paquipleuritis derecha, infarto pulmonar derecho, necrosis centrolobulillar hepática y trombos de fibrina en varios órganos secundarios a CID.

## Discusión y análisis

Los reportes de pericarditis por causas secundarias datan en la bibliografía desde 1899, y aparecen publicados en el Journal of Experimental Medicine, donde los autores Thayer y Lazear exploraron las complicaciones cardíacas de la gonorrea en dos casos de autopsia efectuados en pacientes admitidos en el Hospital John Hopkins en 1895 y 1896 por cuadros “reumáticos”, diagnosticaron septicemia por gonorrea con severo daño cardíaco, incluido el pericárdico, evidenciado por estudio de autopsia en ambos pacientes.

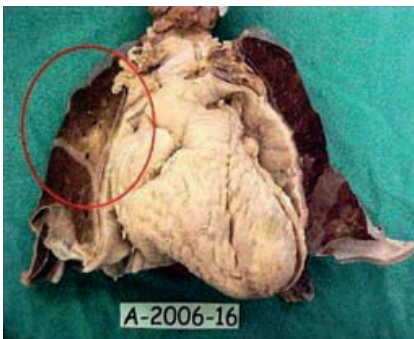
Además, hay reportes de Duval en 1908 y de Mc-Naughton en 1912, en los que presentan excelentes casos de autopsias de pacientes que sufrieron pericarditis secundarias a infecciones bacterianas, una debida a *Neisseria meningitidis*, en un niño de cuatro años de edad, y la otra correspondía a una presentación atípica de tifoidea en un hombre de 21 años que falleció en el curso de la enfermedad.

Artículos más recientes que datan de 1974 dan cuenta de casos de pericarditis asociada con meningitis causados por *Haemophilus influenzae*, reportados por Farooki y col., quienes describieron un caso y en la revisión bibliográfica encontraron 19 más, en seis de ellos describieron ambas afecciones juntas.

En 1978, Garvin y colaboradores publicaron cinco casos de niños con diagnóstico de pericarditis aguda purulenta, dos afectados por *Haemophilus influenzae* y el resto, por otras bacterias, todos fueron detectados a tiempo a través de ecocardiograma y recibieron tratamiento con drenajes pericárdicos y esquemas de antibióticos, lo que permitió que los pacientes mejoraran y fueran dados de alta posteriormente.

**Figura 2.** *Fotografías de hallazgos macroscópicos. A-2006-0016. Se observa en el aspecto macroscópico: A. Momento en el que se aborda la cavidad torácica, se encontraron 350 cc de pus, de la que se tomaron muestras para cultivo, el cual reportó Haemophilus influenzae tipo IVb (laboratorio clínico del Hospital Nacional de Niños Ben-*

jamín Bloom y muestra control enviada al laboratorio central del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social). B. Bloque cardiopulmonar separado del resto de los órganos, se observa la región pericárdica completamente cubierta por detritus celulares, que corresponde a una pericarditis fibrinosa, con aspecto de “pan con mantequilla”. C. Pieza anatómica fijada en formaldehído, en el pulmón derecho se señala una lesión neumónica (círculo rojo) acompañada de engrosamiento parietal en la cisura. D. Aurícula derecha ocupada por un trombo de 2.0 cm, en el ventrículo derecho se encontró otro trombo de igual tamaño que llegaba hasta la arteria pulmonar. E. Estómago abierto por la curvatura mayor, se observan dos parásitos adultos del tipo *Ascaris lumbricoides*. F. Fragmento de íleon en el que había un pequeño vólvulo post mortem, que contenía en su interior otro parásito adulto del tipo descrito. Las figuras de este artículo aparecen a color en el anexo 5 de este número





En 1988, Iggo y Higgins, del Departamento de Cardiología del Hospital John Radcliffe de Oxford, reportaron el caso de una paciente de 64 años de edad que inició un cuadro de vías respiratorias altas caracterizado únicamente por fiebre y dolor severo de garganta, pero que rápidamente evolucionó hasta afectar ambas pleuras y el pericardio, fue diagnosticada a tiempo y sometida satisfactoriamente a drenaje quirúrgico de la secreción purulenta por pericardiotomía y toracotomía, se drenaron 500 mL de pus del pericardio y 300 mL en el espacio pleural, se aisló la bacteria *Haemophilus influenzae* capsular tipo b, por lo que recibió tratamiento con cloramfenicol intravenoso y amoxicilina.

Al momento de publicar el artículo, no existían más casos reportados en adultos en toda Bretaña, y únicamente se describían 10 casos de adultos publicados en la bibliografía mundial.

En las décadas de 1980 y 1990 se publicaron numerosos casos de reportes de pericarditis como complicación rara de enfermedades infecciosas, entre ellas la tuberculosis, histoplasmosis, *Salmonella* no typhi, meningococo, toxoplasmosis, *Legionella*, bacterias purulentas, como el estafilococo y el estreptococo. También aparece asociada con enfermedades autoinmunitarias como la esclerodermia, y como complicación en el curso de uso de medicamentos cardiotoxicos, radioterapia por neoplasias, o cáncer (células en avena del pulmón.). Incluso hay casos muy raros de pericarditis que acompañan la enfermedad de Crohn en el íleon, sin definir si son de novo o consecuencia de la administración de medicamentos.

La evolución clínica del caso presentado se dio de igual manera que los muchos descritos en la bibliografía, la paciente –no protegida con la vacunación– inició con un cuadro febril de vías aéreas superiores, con pocos síntomas, pero en días se complicó gravemente formando la colección de pus en el pericardio.

En el nuevo milenio la mejoría de la tecnología permite el abordaje temprano y la administración de mejores antibióticos, lo que redundará en un pronóstico favorable y en buena evolución clínica para los pacientes afectados por esta enfermedad. El médico debe apoyarse siempre en una buena historia clínica, el hospital debe ofrecer las facilidades para el diagnóstico ecocardiográfico inmediato, contar oportunamente con un cirujano de tórax o médico intervencionista de urgencias para que hagan el drenaje quirúrgico, y se apliquen los antibióticos específicos contra la bacteria en cuestión, esto evita las complicaciones severas, tales como el taponamiento cardíaco que desencadenó la muerte de la paciente.

En el Cuadro 1 se enlistan los signos y síntomas de la pericarditis en niños y adultos, así como los que hacen posible diagnosticar clínicamente el taponamiento cardíaco.



**Cuadro 1.** *Signos y síntomas clínicos de pericarditis aguda y taponamiento cardiaco*

Pericarditis aguda	Taponamiento cardiaco
Historia clínica completa	Historia clínica completa
(infecciones/traumatismos/neoplasias)	Ingurgitación yugular severa
Disfagia	Tonos cardiacos débiles
Tos	Pulso paradójico mayor de 20 mmHg
Hipo	Estrechamiento de la presión del pulso
Disnea	Taquicardia
Distensión de las venas del cuello	Hipotensión
Taquicardia	Disnea
Hepatomegalia	Enlentecimiento del llenado capilar
Roce pericárdico, 80-85%	Hepatomegalia
Dolor precordial (más en adultos), en niños hay más antecedente de malestar,100%	Oliguria

En el cuadro clínico de pericarditis aguda y en el del taponamiento cardiaco, el antecedente clínico es relevante para el diagnóstico etiológico, se espera que la fiebre en los niños oriente más a un proceso infeccioso, ya que en los adultos la pericarditis puede asociarse más con un proceso neoplásico o autoinmunitario.

### Conclusiones

La importancia de publicar el caso radica en evidenciar la naturaleza atípica de la presentación clínica, la evolución rápida que no permitió una atención más oportuna por parte de los médicos tratantes, y la aparición de la complicación lógica, como es el taponamiento cardiaco como causa de muerte. Es de notar la existencia de parásitos de tipo nematodo en varias vísceras gastrointestinales y en el pulmón derecho, lo que causó un foco neumónico eosinofílico en dicho pulmón (de probable evolución crónica), pero que seguramente dejó proclive a la niña a adquirir la severa infección bacteriana.

El parasitismo intestinal y en otros órganos es muy frecuente en niños salvadoreños que llegan a la mesa de autopsias de este hospital por diferentes enfermedades, ya que debido a la alta contaminación de los mantos acuíferos, no toda la población tiene acceso a agua potable, y la falta de este recurso, aunada a una mala disposición de excretas, ocasiona un círculo vicioso: el paciente llega enfermo al hospital, se cura o se mejora y es enviado a vivir nuevamente en las condiciones de exposición ambiental a las que está sometido de manera crónica, lo que, en lugar de ser un problema de salud, se torna un complicado problema social y ambiental en El Salvador.

Se confirma lo mencionado en la bibliografía sobre la enfermedad pericárdica, ésta se asocia más frecuentemente con otras afecciones acompañantes, la presentación clínica aislada como tal es muy inusual.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a los técnicos de Anatomía Patológica del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, del área de autopsia y los del laboratorio de histopatología, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible realizar este informe.

Además, quiero agradecer a la Lic. Dilcia de Valencia, Jefa del Área de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom por la realización de los cultivos y proporcionar la información de archivo. A la Lic. María Guadalupe de Guzmán, Jefa de Laboratorio Central y a su personal de apoyo de Bacteriología por hacer posible los controles ciegos del cultivo y ser un apoyo incondicional al Hospital. Por último, y muy importante para mi país, es el apoyo que recibimos siempre de Sherif R Zaki MD, PhD, Jefe de Patología de Enfermedades Infecciosas, de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, quien desde que solicité el apoyo a su institución, él y su equipo efectuaron este y otros controles de calidad para establecer causas infecciosas en los pacientes del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, sin costo alguno para la institución ni el Gobierno de El Salvador.



## Bibliografía

1. The Pink Book: Chapters: Epidemiology and Prevention of Vaccine Preventable Diseases, (sitio en internet, Actualizado 11<sup>a</sup> ed., Mayo 2009), disponible en: URL: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pink-chapter.htm>
2. Danovaro-Holliday MC, Garcia S, de Quadros C, Tambini G, Andrus JK. Progress in vaccination against *Haemophilus influenza* type b in the Americas. PLoS Med 2008;5(4):e87. doi:10.1371/journal.pmed.0050087.
3. Prophet EB. AFIP, Laboratory Methods in Histotechnology by Armed Forces Institute of Pathology. Spiral-Bound, 1992.
4. Thayer WS, Lazear JW. A second case of gonorrhoeal septicaemia and ulcerative endocarditis with observations upon the cardiac complications of gonorrhoea. J Exp Med 1899;4(1):81-116.
5. Duval C. Septicemia with acute fibrino-purulent pericarditis and hypopyon iritis caused by meningococcus. J Med Res 1908;19(2):259-268.
6. McNaughton MWA, Rhea LW. A report of two cases of typhoid fever which show uncommon lesions due to the bacillus typhosus. 1. Acute purulent pericarditis. 2. Acute hæmorrhagic pleuritis. Can Med Assoc J 1912;2(9):795-800.
7. Thébaud B, Sidi D, Kachaner J. Purulent pericarditis in children: a 15 year-experience. [In French]. Arch Pediatr 1996;3(11):1084-1090.
8. Permanyer-Miralda G. Acute pericardial disease: approach to the aetiologic diagnosis, Heart 2004;90(3):252-254.
9. Farooki ZQ, Henry JG, Green EW. *Hemophilus influenzae* pericarditis associated with meningitis. A treatable fatal disease. Clin Pediatr 1974;13(7):609-610.

10. Garvin PJ, Danis RK, Lewis JE Jr, Willman VL. Purulent pericarditis in children. *Surgery* 1978;84(4):471-475.

11. Iggo R, Higgins R. Bilateral empyema and purulent pericarditis due to *Haemophilus influenza* capsular type b. *Thorax* 1988; 43:582-583.

12. Kupferschmidt H, Langenegger T, Krähenbühl S. Pericarditis in chronic inflammatory bowel disease: underlying disease or side effects of therapy? Clinical problem solving. [Article in German]. *Schweiz Med Wochenschr* 1996; 126(50):2184-2190.

13. Ortega Montes A, Jimenez Liria R. Pericarditis en la edad pediátrica. *Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Cardiología Pediátrica*. España: Almeria; 2005, Cap 25, página 1-9.

14. Oliver Navarrete C, Marín Ortuñoa F, Pineda Rocamora J, Luján Martínez J y col. ¿Debemos pensar en una etiología específica en pacientes con taponamiento cardiaco? *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:493-498.

15. Kabbani MS, Najm H, Godman. M. Five children with purulent pericarditis and review of the literature. *Ann Trop Paediatr* 2004; 24(1):95-101.

16. Merino Rivas JL, Arambarri Segura M, Quereda Rodríguez-Navarro C, Dronda Núñez F. Acute pleuropericarditis in a patient with Crohn's disease controlled with chronic therapy with mesalazine. *Rev Clin Esp* 2002; 202(2):122-123.

17. Manomohan V, Subbuswamy SG, Willoughby CP. Crohn's disease and pericarditis. *Postgrad Med J* 1984;60(708):682-684.

## Capítulo 3. Nutrición



# **“Atol Shuco”, a Traditional Corn-Fermented Salvadorian Beverage: Phytochemical, Microbiological and Nutritional Considerations<sup>6</sup>**

**Downloaded via** UNIV ILLINOIS URBANA-CHAMPAIGN on October 15, 2022 at 20:50:18 (UTC). See <https://pubs.acs.org/page/policy/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.

Email: [lamejia@illinois.edu](mailto:lamejia@illinois.edu)

Luis A. Mejía<sup>1</sup>

Marvin J. Núñez<sup>2</sup>

Brenda Gallegos<sup>3</sup>

Juan Agustín Cuadra<sup>4</sup>

Ulises G. Castillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Human Nutrition University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801, United States; <sup>2</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, Final Avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, San Salvador, El Salvador; <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, Final Avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, San Salvador, El Salvador; <sup>4</sup>Departamento de Análisis Químico e Instrumental. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, Final Avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, San Salvador, El Salvador.

Corn (*Zea mays* L.) has been a source of nourishment for inhabitants of Mesoamerica since ancient times. It has been consumed in several forms as an ingredient of various culinary preparations. One of them is “Atol shuco” (name of Nahuatl origin), a traditional corn-fermented hot beverage, typical of El Salvador and neighboring Guatemala and Honduras, with some variations. “Atol shuco” is deeply embedded in Salvadorian culture and has endured for hundreds of years as a source of energy and nutrients for the population. It consists of a fermented preparation of black corn, that after filtering and

heating, is added at the time of serving with common black or red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and a powder or paste preparation of roasted pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds known as “Alguashte”. A hot homemade “Chile” (*Capsicum annuum* L., var. *glabriusculum* or *Capsicum frutescens* L.) sauce may be added if desired. Sugar is sometimes added in some regions. Traditionally, the “Atol shuco” is commonly consumed early in the morning or at the end of the day, on populated streets mainly by workers going to or returning from work. Little is known about the phytochemical or microbiological characterization of “Atol shuco”. However, based on the composition of its ingredients and the known nutritional effect of fermentation on the grain it is believed it provides an important nutritional contribution to consumers.

## Introduction

Corn (*Zea mays* L.) is a cereal grain that has nourished Mesoamerica inhabitants since pre-Hispanic times. One of the theories about the origin of this grain indicates that it is derived from a Gramineae known as “Teosinte” (*Zea mexicana*), domesticated about 7,000 years ago in Southern Mexico from which it spread to Mesoamerica and Andean region in South America (1). Corn in El Salvador is a staple food that provides energy, protein, and some micronutrients to the population. According to the Salvadorian government Center for Agricultural Technology (CENTA), corn consumption in the country is about 80.8 kg/year in urban areas and 127.9 kg/year in rural regions (Cited by Cortez-Azenón & Ayala-Durán) (2). It is widely consumed in various forms such as “Tortillas”, “Pupusas”, “Tamales”, “Riguas”, “Pastelitos” and several types of “atoles”, including the so-called “Atol shuco” (name of Nahuatl origin). “Atol shuco” is a corn fermented, non-alcoholic, hot beverage typical of El Salvador and neighboring countries Guatemala and Honduras, with regional variations. It is produced by spontaneous fermentation of the corn triggered by naturally occurring bacteria present in the grain. According to similarly fermented corn products like “Atole agrio” in South-Eastern México (3), “Masa agria” in Colombia (4), and “Chicha” in Perú (5), the fermenting microbiota in these typical

foods is believed to be represented primarily by Lactic Acid Bacteria (LAB), Acetic Acid Bacteria (AAB) and yeast. Preliminary studies in our laboratory at the School of Chemistry and Pharmacy of the University of El Salvador suggest that this may be also the case for “Atol shuco”. “Atol shuco” is prepared artisanally at home and sold openly in populated streets. According to what is presumed to be the most original Salvadorian recipe, the main “Atol shuco” ingredient is black/purple corn (*Z. mays*) known as “Maiz negrito” (6–8). Although the production process may have some variations, in general, the corn is first soaked in water, fermented overnight, ground, filtered, and cooked. The resulting product is a slightly purple or reddish hot beverage that is added, at the time of consumption, with flavoring ingredients that complement its nutritional value. Variations in the preparation process in different geographical regions depend on the culture and availability of ingredients (9).

Corn fermentation produces important biochemical, organoleptic, nutritional, and enzymatic changes with potential health benefits of the resulting product (10, 11). Upon fermentation, corn releases anthocyanins, potent antioxidants known to protect against chronic diseases like diabetes, cardiovascular disease, and cancer (12). The flavor of corn fermented products, such as “Atol shuco”, also becomes acid as the pH decreases due to the formation of acetic and lactic acids. In addition, due to bacterial synthesis, the content of protein and amino acids increases, particularly in regard to essential amino acids like lysine, which is limited in corn (10). Phytases also become activated degrading the content of phytic acid, a known inhibitor of intestinal absorption of minerals in cereal grains. Moreover, phenolic compounds in purple corn, have been reported to possess potential health benefits (13). Besides the described nutritional effects of corn fermentation, the inclusion of beans and “Alguashte” to the “Atol Shuco”, contributes further to the content of nutrients like vitamins, minerals and dietary fiber.

“Atol shuco” is commonly consumed in the country as the sunrise, or at the end of the day, in cities and villages as provided by street vendors. Consumers are usually men in their way to work or, at ti-

mes, returning from an overnight drinking party, hoping it will aid with the resulting hangover. Consumption of this beverage is also an expression of celebration in popular festivities known as “Alboradas”. The beginning of the annual “fiestas patronales” in towns and villages is traditionally celebrated by musical parades and fireworks in early morning hours at which time “Atol shuco” is given free to participants (14).

In El Salvador, the consumption of “Atol shuco” is a cultural tradition; part of the folklore that provides energy and nutrients to the population. The objective of this chapter is to describe existing information on the preparation process, phytochemistry, microbiology, and nutritional composition of “Atol shuco” and its ingredients, as well as its potential nutrition and health implications. It also intends to identify knowledge gaps and research opportunities around this typical food product.

## **Production Process**

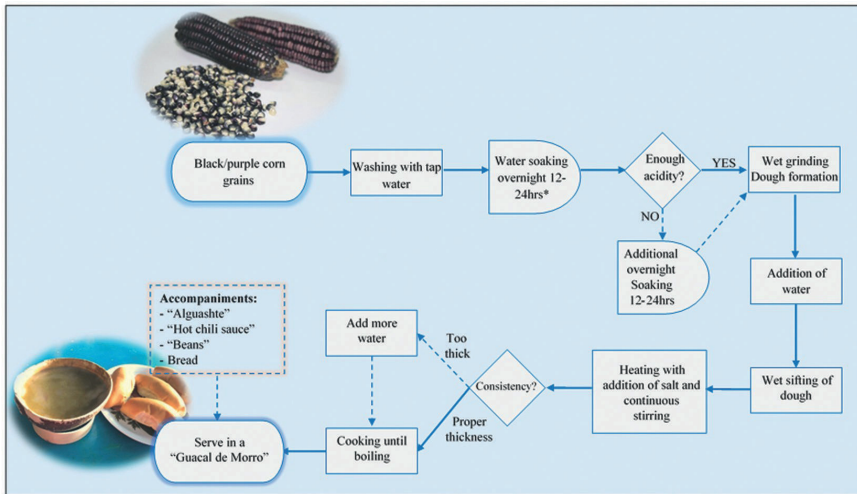
The manufacturing of “Atol shuco” is an artisan process consisting of the natural and spontaneous fermentation of black or purple corn (*Z. mays*) that after cooking results in a hot and sour beverage (11). The current process reflects the same fermentation procedure utilized ancestrally. However, some adaptations have been made in the process with modernization and the availability of ingredients and cooking devices that facilitate its preparation.

## **Traditional Procedure**

Figure 1 shows the flow diagram for the production process of “Atol shuco”. It is based on available regional literature (9, 15), direct knowledge of the authors, and a recent survey conducted by the authors among individuals who were familiar with the preparation process of the beverage as made in several regions of the country.



**Figure 1.** Flow chart for the preparation of Atol chuco. \*Fermentation begins.



The starting material is black or purple corn known as “Maíz negrito” (*Z. mays*), whose color intensity depends primarily on its content of anthocyanins (16, 17). The corn is first washed, 2-3 times, by rinsing and decanting using tap water. To start the fermentation process, tap water is added in a 2:1 ratio and this corn/water mixture is stored overnight in a cool place, away from direct light, and then covered with a tablecloth for approximately 12-24 h. After overnight fermentation, the grains are tested organoleptically for acidity by biting a few grains of corn and if acidity is acceptable, the corn is ground using a stone mill (“piedra de moler”) to form a soft corn dough known as “masa”. If a stone mill is not available, an industrial mill or even a heavy-duty blender could be used.

However, when the level of acidity is not satisfactory, the corn/water mixture is allowed to continue fermentation overnight for an additional 12-24 h and then ground. Alternately, the unsatisfactory acid wet corn is ground anyway, and the resulting dough (masa) is fermented for an additional 12-24 h. The dough obtained by either fermentation option is then sifted through a cheesecloth. Additional water is added as needed to facilitate the sifting process. The resul-

ting filtrate is added with a small amount of salt and then heated with continuous stirring using a wood-burning stove or a regular gas stove, for approximately 5 min. This step stops fermentation. Additional water is added if the consistency of the heated corn solution is too thick, and no additional water is needed if the consistency is appropriate for consumption as a beverage.

The corn solution with the desired thickness is then cooked until boiling. The “Atol shuco” is now ready to be consumed hot in a container made of the exocarp of the “Morro” fruit (*Crescentia alata* Kunt), known as “Guacal de morro” or in any other suitable drinking container. Traditionally, flavoring ingredients are added to the “Atol shuco” at the time of serving. One is a paste or powder preparation known as “Alguashte” or “Aiguaste” consisting of ground roasted pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.), that provides a salty and gritty flavor to the product. In addition, boiled black or red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are now commonly added to the “Atol shuco” instead of the more traditional “frijol mono” (*Vigna unguiculata* L. Walp) used in the past due its scarcity. A homemade hot sauce made with either “Chile chiltepe” (*Capsicum annuum* L., var. *glabriusculum*) or a red pepper variety locally known as “Cola de Gallo” (*Capsicum frutescens* L.), is then sprinkled over the product according to taste. The consumption of “Atol shuco” is commonly accompanied by bread known as French bread (“Pan Frances”).

Figure 2 shows the wet grinding of fermented black corn (“maíz negrito”), using a traditional stone mill known as “Piedra de moler”. This step leads to the formation of the dough (“masa”).

**Figure 2.** *Grinding of the fermented corn using a stone mill (“Piedra de moler”) and initial dough formation*



### Variations of the Traditional Procedure

The preparation of “Atol shuco” has undergone through time various adaptations related to the availability of ingredients, cultural factors, and modernization, particularly in urbanized areas. An example is the substitution of the stone mill for the use of an industrial mill or even a blender. To facilitate the process further, commercially available black/purple flour is sometimes used instead of whole corn. In the same way, utensils used in the more artisan preparation have been changed for the use of metal or aluminum kitchen tools and pots. Furthermore, “Frijol mono” (*V. unguiculata* L. Walp.), an original ingredient used in ancient times, has been gradually replaced by common black or red beans (*P. vulgaris*) because of its limited availability. In addition, changes in the process are also made in some regions of the country as in the east, where people prefer a sweet-pinked “Atol shuco” by adding food-grade red color consisting of a combination of Red 40 and Ponceau Red (9, 18) and a small amount of sugar. Other not very common modifications are

nixtamalization of the corn before fermentation by adding quicklime while boiling and the roasting of the grains before fermentation. The effect of these latter modifications in the fermentation process of “Atol shuco” has not been documented.

### **Organoleptic Characteristics**

Fermentation of the black or purple corn leads to the development of a grayish-purple color of the “Atol shuco” due to the release of anthocyanins, and to acquiring an acid flavor related to a lowering of pH (19). Adding “Alguashte” to the “Atol shuco” lowers the acid taste and gives the product a pleasant sandier texture and a greyish-green color. The addition of cooked beans can also significantly modify the flavor of the “Atol shuco”. Cooked beans incorporate the broth from the bean cooking process, transferring its characteristic bean flavor into the beverage. Depending on the amount of hot sauce added, the “Atol shuco” can be hot and spicy to taste and that is why it is a serving ingredient that can be omitted or used only in small amounts, depending on preference.

### **Phytochemical Composition of “Atol Shuco” Ingredients**

The phytochemical composition and brief descriptions of the main secondary metabolites of ingredients used in the preparation of “Atol shuco” are presented in the following sections.

#### **Black/Purple Corn (*Zea mays* L., Poaceae)**

In Mexico, Central, and South America, corn exhibits a high diversity recognized phenotypically by color, grain shape, grain size, cob, and plant characteristics. Colored corn, referred to as blue, red, purple, or black corn are botanically the same species as white and yellow (20). The corn typically used in the preparation of “Atol shuco” is black or dark blue corn. The color intensity is due to the content of anthocyanin (21).

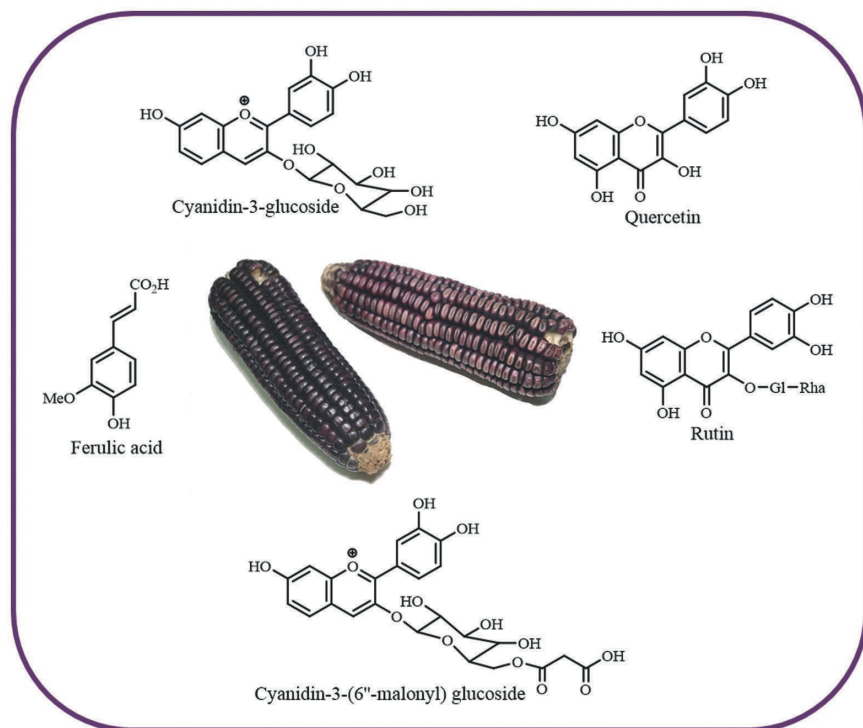
Besides a high content of flavonoids like anthocyanins, colored corn contains p- hydroxycinnamic acids, and in minor proportions, also carotenoids, phytosterols, vitamin E, lignans, policosanols, and xylans (20). In this regard, colored corn is considered the cereal with the highest anthocyanin concentration. Anthocyanin, which has a positive charge at the oxygen atom of the C-ring of its basic structure, has been found to possess antidiabetic, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-obesity properties, as well as a role in the prevention of cardiovascular disease (22). Furthermore, pigments from black glutinous corn have been shown to possess potent antihyperlipidemic effects in high-fat-fed mice by improving the serum lipids profile and reducing the atherogenic index of the animals (23). Anthocyanin in corn grains is found in the aleurone layer, pericarp, or in both grain structures, and differ in concentration and structural distribution in the grain (24). The major anthocyanins in colored corn (purple, red, and blue) are cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-(6"-malonyl) glucoside (20) (Figure 3). Different corn varieties contain significantly different anthocyanins. Thus, blue, red, and purple corn possess a higher concentration of anthocyanidins (up to 325 mg/100 g DW) including cyanidin derivatives (75%-90%), peonidin derivatives (15%-20%), and pelargonidin derivatives (5%-10%) (21).

The antioxidant activity and content of phenolic compounds and anthocyanidins of eighteen corn strains, including four black varieties, have been studied in México (25). In this investigation, the anthocyanin, phenolic, and ferulic acid contents in the black corn varieties ranged from 76.2 to 120.0 mg of cyanidin-3-glucoside/100g, 457 to 565 mg of gallic acid/100g, and 151 mg of ferulic acid/100g, respectively. Furthermore, the antioxidant activity of the four black corn varieties showed values of radical scavenging activity between 74 to 92%, like other pigmented corns. Rutin, hirsutrin, morin, kaempferol, quercetin, naringenin, hesperitin, and their derivatives are the most reported flavonoids in purple corn (26) (Figure 3).

Colored corn grown in El Salvador has been little studied from the phytochemical and bromatological point of view. Only basic bro-

matological analyses have been reported in comparison to other better studied native and hybrid corn varieties (27).

**Figure 3.** Main secondary metabolites isolated from colored corn

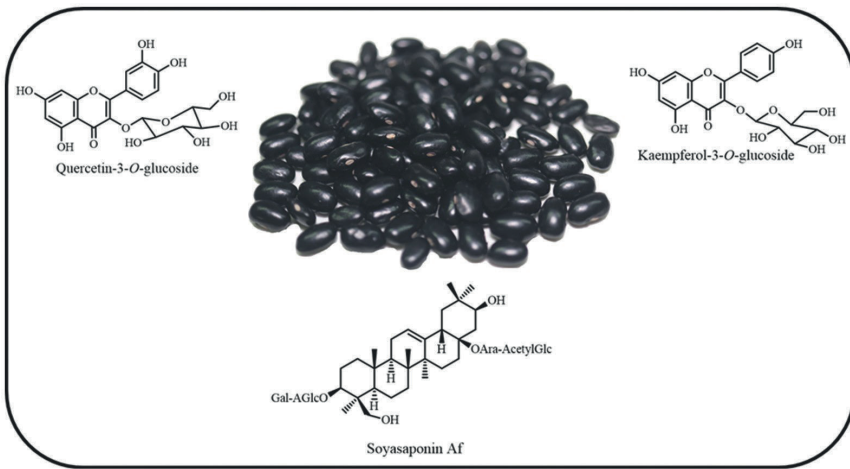


### Black/Red Beans (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae)

Black and red beans (*P. vulgaris*), in different culinary forms, have been two of the most widely consumed foods by the Salvadorian population for decades (28). Both beans have diverse secondary metabolites, but black bean stands out for its high content of anthocyanins, polyphenols (range 503.2-1062 mg/100 g of raw beans and 210-711 mg/100 g of cooked bean), and flavonoids such as quercetin 4-O-galactoside, quercetin 4-O-glucoside, myricetin 3-O-glucoside, and kaempferol 3-O-glucoside (Figure 4). This composition makes black beans a grain with excellent antioxidant capacity (29). In ad-

dition, the black bean has a recognized hypolipidemic activity (30). Other secondary metabolites frequently found in common beans are saponin glycosides, which have a steroidal or pentacyclic triterpene skeleton containing one or more sugar molecules on their structure. Soyasaponin Af (Figure 4) is one of the major bidesmosidic triterpene saponin glycosides isolated from black bean, a metabolite that can prevent hepatic lipid accumulation (30).

**Figure 4.** *Flavonoids and saponin isolated from black bean (P. vulgaris)*



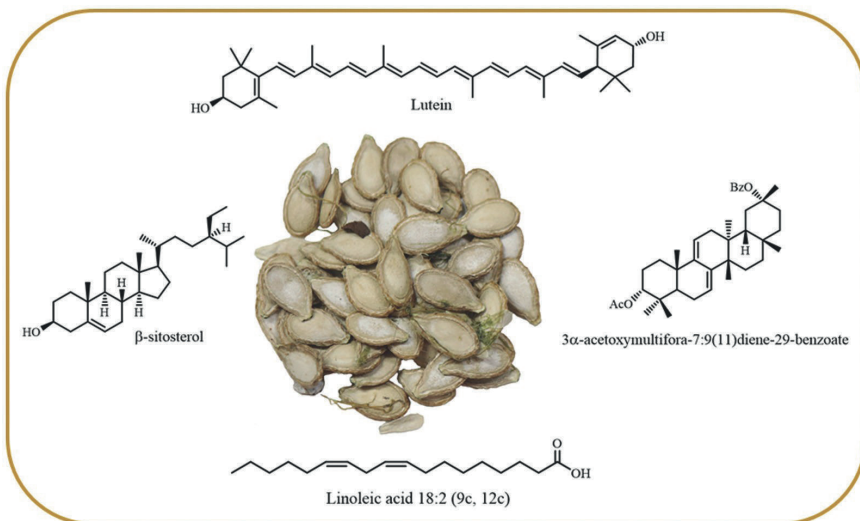
## Pumkin “Ayote” (*Cucurbita pepo* L, *Cucurbitaceae*)

“Ayote” (*C. pepo*) is one of the oldest known plant species cultivated by indigenous people throughout Mexico, Central, and North America, even before the arrival of Europeans (31). The roasted seeds of “Ayote” are used in El Salvador in the preparation of “Alguashte”, utilized as an added ingredient of “Atol shuco” at the time of its consumption (28). The seeds are also used in Central America’s traditional medicine as a vermifuge, diuretic, antipyretic, analgesic, and for treating gastrointestinal problems and burns (31).



The “Ayote” seeds contain diverse secondary metabolites, among them, carotenoids such as lutein,  $\beta$ -carotene, lutein epoxide,  $\alpha$ -carotene, violaxanthin, flavoxanthin, luteoxanthin, chrysanthemaxanthin and  $\alpha$ -cryptoxanthin (32). Other identified compounds include unsaturated fatty acids (mostly oleic and linoleic acids), tocopherols and phytosterols like spinasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta^7$ -stigmasterol,  $\Delta^7,25$ -stigmastadienol and squalene (33) (Figure 5). These compounds determine the good nutritional quality of *C. pepo* seed oil. Tanaka also reported in 2013 the presence in the seeds of multiflorane-type triterpenoids,  $3\alpha$ -p-nitrobenzoylmultiflora-7:9(11)-diene-29-benzoate,  $3\alpha$ -cetoxy-multiflora-7:9(11)-diene-29-benzoate,  $3\alpha$ -acetoxymultiflora-5(6):7:9(11)-triene-29-benzoate,  $3\alpha$ -p-amino-benzoylmultiflora-7:9(11)-diene-29-benzoate, and  $5\alpha,8\alpha$ -peroxymultiflora-7:9(11)-diene-3 $\alpha$ ,29-dibenzoate (34) (Figure 4). In addition, the seeds contain acylated phenolic glycosides as well as cucurbitosides F-M (35).

**Figure 5.** Some metabolites reported in the seeds of *C. pepo*





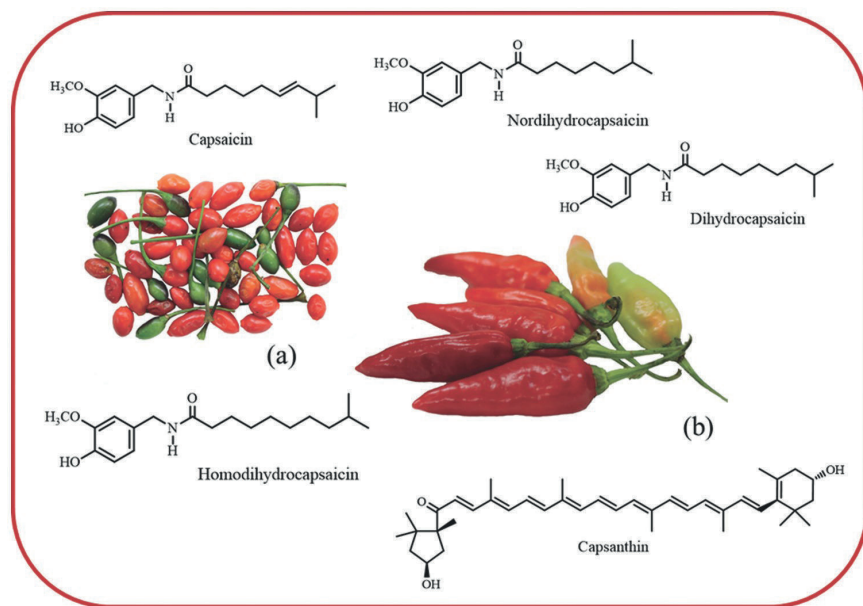
**“Chile Chiltepe” (*Capsicum annum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill, Solanaceae) and “Chile Cola de Gallo” (*Capsicum frutescens* L., Solanaceae)**

*Capsicum* is one of the most important genera in the Solanaceae family, composed of approximately thirty species, originally from Central and South America (36). The ripe fruits of the different varieties of peppers (*Capsicum* spp.) have been traditionally used as pigments, food spices, and in the treatment of stomach disorders and headaches. In traditional Salvadorian medicine, *Capsicum* species are used for inflammation, pain, stomach cramps, digestion, and rheumatism (37). A food use of *C. annum* var. *glabriusculum* (“Chile Chiltepe”) or *C. frutescens* (“Chile Cola de Gallo”) is their incorporation in the hot sauce added to the “Atol shuco”.

The best-known metabolites isolated from the *Capsicum* genus are the alkaloids called capsaicinoids (Figure 6). Thus, the presence of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, and homodihydrocapsaicin has been reported from the fruits of *C. frutescens* and *C. annum* (36). Carotenoids are also found in the fruits of such species, being the most abundant  $\beta$ -carotene, capsanthin (Figure 5), and lutein (38).

In addition, phytochemical analyses of ethanolic and aqueous extracts of four varieties *C. annum* and *C. frutescens* have revealed the presence of phenols, flavonoids, and proanthocyanidins; these extracts also showed significant antioxidant activity (39).

**Figure 6.** Capsaicinoids and capsanthin isolated from fruits of (a) *C. annuum*, var. *glabriusculum* and (b) *C. frutescens*

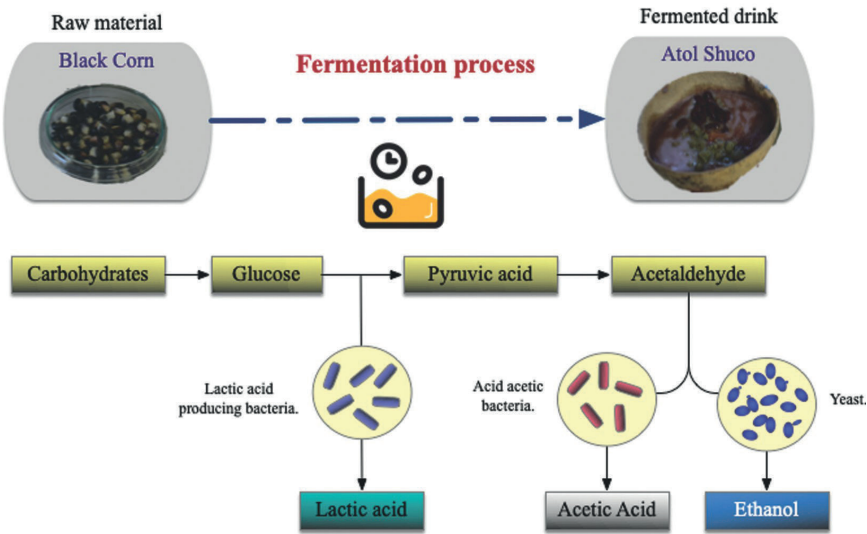


## Microbiology of the Fermentation Process of “Atol Shuco”

The process of spontaneous fermentation of corn has been recently reviewed by Chavez- López et al., covering the microbiological and biochemical changes through fermentation of several corn-based foods in various countries (11). However, in El Salvador, there is no specific information in the scientific literature about the microbiota present during the fermentation process of “Atol shuco”. Therefore, a preliminary study has been initiated, by one of the authors (J.A.C.) at the laboratory of bromatological analysis of the school of Chemistry and Pharmacy of the University of El Salvador. The objective of this ongoing investigation is to identify the main microorganisms that intervene in the various stages of preparation of “Atol shuco”. Detection and quantification of bacteria and fungi have been conducted by culture techniques described in the manual for the mi-

crobiological examination of food and water (40). Bacteria identification has been made by using selective cultures and Gram staining; and for fungi and yeast, selective media and microscopic examination (41). Preliminary results have revealed that the main genera of microorganisms present after 12-24 h of fermentation of black corn ("Maíz negrito"), as when making "Atol shuco", are Lactic Acid Bacteria (LAB) ( $6.5 \times 10^4$  CFU/mL), particularly *Lactobacillus*; Acetic Acid Bacteria (AAB) ( $3.6 \times 10^3$  CFU/mL), primarily *Acetobacter*; and yeast (*Saccharomyces*) ( $3.3 \times 10^2$  CFU/mL) (Figure 7). Other microorganisms detected included Coliform spp. ( $2.7 \times 10^4$  CFU/mL) and molds (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, and *Paecilomyces*) ( $2.0 \times 10^1$  CFU/mL). There were no microorganisms detected in the final phase when the product was ready for consumption. LAB are particularly important since microorganisms in this genus produce, through lactic acid fermentation, vitamins, organic acids, and enzymes which have beneficial nutritional and health implications (42). On the other hand, *Acetobacter* in the presence of oxygen converts alcohol into acetic acid, thus contributing to the sour flavor of "Atol shuco". Furthermore, the generated lactic and acetic acids lower the pH creating an unfavorable acid environment for bacterial growth (43). This phenomenon, in conjunction with the effect of heating and boiling of the "atole shuco" during processing (Figure 1), plus the capacity of fermentation to inactivate mycotoxins in corn (44) contributes to the safety of the product. This interpretation is supported by the absence of detected microorganisms in the final phase of our study.

**Figure 7.** Overview of the fermentation process of “Atol shuco” and main participating microorganisms



Somewhat similar food products based on corn fermentation have been investigated in other Latin American countries. They are, “Atole agrio” in México (3), “Masa agria” in Colombia (4), and “Chicha” in Perú (5). As in “Atol shuco”, Mexican “Atole agrio” contains mainly LAB, being particularly dominant in the liquid fraction *Lactobacillus* and other genera like *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, and *Lactococcus*. Bacteria species include *Lc. pseudomesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *W. confuse*, and, *Weissella paramesenteroides* (3). Fermentation of “Masa agria” is also dominated by LAB and AAB (4). The predominant genera in this product are *Lactobacillus*, *Weissella*, and *Acetobacter*. Common species reported include *Lactobacillus plantarum* and *Acetobacter fabarum* (4). In Peruvian “Chicha”, the core microbiome is also represented by Lactic and Acetic Acid bacteria, primarily *Lactobacillus* and *Acetobacter*, respectively (5). We can see then that the main microbiota of all four corn fermented products, including “Atol shuco”, is the same, LAB and AAB and yeast.

Some genera and specific bacteria species found in “Atole agrio”, “Masa agria” and “Chicha” have not been reported in “Atol shuco”. This dissimilarity in the microbial composition may be related to the fact that the presence of specific bacteria in the products may differ depending on the raw materials used, manufacturing process, and geographical influences as demonstrated in chicha produced in different Peruvian regions (5). Another possible reason is the methodology used to detect and identify the microorganisms. The microorganisms in “Atol shuco” have been detected and identified by traditional culture-dependent phenotypic morphology analysis while those in the other products were analyzed using more sensible molecular methods such as high throughput sequencing of 16S rRNA.

## Nutritional Contribution and Potential Health Benefits of “Atol Shuco”

As a result of fermentation, the nutritional contribution of fermented foods results not only in the provision of an enhanced nutrient content but also in the generation and release of bioactive compounds that may benefit health (10, 45). Considering the nutritional composition and health attributes of colored corn, its evaluation is warranted as it may contribute to the nutritional and health value of “Atol shuco”.

Table 1 presents the nutrient composition of “Atol shuco” as reported by the Institute of Nutrition of Central America, Panama (INCAP) (46). On a 100 grams basis, “Atol shuco” provides 37 Kcal, 0.30 g protein, 0.30 g fat, 8.30 g carbohydrates, 12 mg calcium, 43 mg phosphorus, 1.00 mg iron, 0.22 mg thiamin, 0.26 mg niacin, and 0.01 mg riboflavin. Dietary fiber and other vitamins and minerals are not reported.

Table 1. Nutrient Composition of “Atol Shuco”<sup>a</sup>

Macronutrients	In 100 g
Water (g)	89.79
Caloric value (Kcal)	37.00
Protein (g)	0.30
Fat (g)	0.30
Carbohydrate (g)	8.30
Dietary Fiber (g)	NRNR b
Micronutrients	
Calcium (mg)	12.00
Phosphorus (mg)	43.00
Iron (mg)	1.00
Thiamin (mg)	0.22
Riboflavin (mg)	0.01
Niacin (mg)	0.26

a Data from reference (46). b NR=Not reported.

An estimate of the total nutrient content of “Atol shuco”, when considering the nutritional contribution of added flavoring ingredients at the time of consumption is presented in Table 2. This estimation is based on approximate portion sizes of “Atol shuco” and added ingredients customarily consumed by adult individuals, as determined by one of the authors (B.G.) as follows: “Atol shuco” alone: 250 g, dry uncooked black beans (*P. vulgaris*): 8.4 g (equivalent to 30 g of cooked beans (47), “Alguashte” (*C. pepo*): 15 g, hot pepper sauce (*C. annum*): 2 g and table salt 3 g. The added ingredients significantly increase the content of most nutrients. The energy content of an initial 250 g portion of “Atol shuco” increases by about 117%, covering 10% of energy needs for an adult. The protein content increases greatly to 919% due to the contribution of beans. According to INCAP’s RDA, all macronutrients reach a dietary coverage above 10% of the daily recommendations (48).

The increase in dietary fiber cannot be determined because the fiber content is not reported for “Atol shuco” in INCAP’s food composition table, but the addition of “Alguashte” provides about 9% RDA for dietary fiber. Among minerals, phosphorus experiences the highest increase (196%) followed by iron (115%). Among vitamins, riboflavin increases about 253%. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), black bean is a good source of essential aromatic amino acids (methionine and cysteine), therefore when combined, protein quality improves (49). Thus, the corn and bean combination make “Atol shuco” a nutritive beverage, particularly if the proportion of corn and beans is around 70:30 (p/p).

On the other hand, the fermentation process has important nutritional effects on corn that include improvement of protein quality, increase in phenolic compounds and lowering of anti-nutritional factors and aflatoxins. Cui et al. determined the effect of fermentation on the nutritional value of four maize cultivars fermented for three days (10). This study revealed that fermentation increased the protein content by 43.5% but most importantly, there was a significant increase in amino acid content up to 131%, particularly of the essential amino acid Lysine that increased 93.9% - 131.5% in the different corn cultivars. This study also showed that the phytic acid content of the fermented corn decreased by 24.3% suggesting that fermentation may also improve the bioavailability of minerals by lowering the levels of antinutritional factors, such as phytates that inhibits the absorption of iron (10). From the food safety point of view, studies also indicate that fermentation can decrease the level of mycotoxins in corn (44, 50). As described by Adebisi et al., several factors are responsible for this effect that include generation of metabolites by fermentation, activation of enzymes, lowering of pH and even the physical binding of the toxins by the fermenting microorganisms (44). Aflatoxins and ochratoxins are common toxins in Salvadorian grains, particularly in corn (51).

Besides the nutrient content, corn has a wide range of phytochemicals exhibiting health benefits. They include phenolic acids such

as ferulic, coumaric, and syringic acids as well as flavonoids such as anthocyanins, all related to the prevention of chronic diseases such as cardiovascular disease, type 2 diabetes, and obesity (52). Purple corn (*Z. mays*) has been evaluated regarding the relationship of phenolic composition with its anti-inflammatory, anti-adipogenic, and anti-diabetic potential (13). In this *in vitro* study, anthocyanins, quercetin, luteolin, and rutin were the dominant compounds with anti-inflammatory and anti-diabetic effects. In addition, quercetin and vanillic and protocatechuic acids were closely associated with the anti-adipogenic properties of the tested colored-corn extracts. In a follow-up study, mice fed for 12 wk with a diet containing a colored maize extract rich in anthocyanins and ferulic acids, reduced adipogenesis and adipose inflammation and promoted energy expenditure suggesting that these compounds may contribute to the prevention of obesity (53).



**Table 2.** Estimation of the Nutritional Content of “Atol Shuco” Considering the Nutrient Contribution of Added Ingredients at the Time of Consumption

Nutrient	Atol shuco alone	Black beans	Alguashte (powder)	Hot Chili Sauce Table Salt	Nutrient content per final portione	% Nutr increase <sup>f</sup>	% RDAG
Portion sizes (g)	250 <sup>b</sup>	8.4 <sup>d</sup>	15	2	3	278	
Energy (Kcal)	92.50	28.8	78.3	0.76	0.00	200	10
Protein (g)	0.75	1.91	4.95	0.04	0.00	7.64	10
Fat (g)	0.75	0.13	6.32	0.01	0.00	7.22	13
Carbohydrate (g)	20.75	5.17	2.01	0.16	0.00	28.10	9
Fiber (g)	NR <sup>c</sup>	1.54	0.59	NR <sup>c</sup>	0.00	2.13	9
Calcium (mg)	30.00	11.26	6.45	0.40	0.72	48.83	63
Phosphorus (mg)	108	34.86	176	0.56	0.00	319	196
Iron (mg)	2.50	0.60	2.24	0.03	0.01	5.38	115
Thiamin (mg)	0.55	0.04	0.03	0.00	0.00	0.62	13
Riboflavin (mg)	0.03	0.01	0.05	0.00	0.00	0.09	253
Niacin (mg)	0.65	0.18	0.26	0.03	0.00	1.12	72
Vitamin C (mg)	0.00	0.08	0.30	1.82	0.00	2.20	4
Vitamin A Retinol Equiv. (mcg)	NR <sup>c</sup>	0.00	2.85	0.32	0.00	3.17	0
Monounsaturated fatty acids (g)	NR <sup>c</sup>	0.01	1.97	0.00	0.00	1.97	18
Polysaturated Fatty acids (g)	NR <sup>c</sup>	0.02	2.88	0.01	0.00	2.89	13
Sat. fatty acids (g)	NR <sup>c</sup>	0.02	1.20	0.00	0.00	1.20	5
Cholesterol (mg)	NR <sup>c</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0

Potassium (mg)	NR <sup>c</sup>	122.98	120.90	6.80	0.24	128	3
Sodium (mg)	NR <sup>c</sup>	0.67	1.12	0.14	3	1164	78
Zinc (mg)	NR <sup>c</sup>	0.21	80.10	0.01	0.00		
Magnesium (mg)	NR <sup>c</sup>	0.08	0.01	NR <sup>c</sup>	0.03		80.32
Vitamin B6 (mcg)	NR <sup>c</sup>	0.04	0.00	0.01	0.00		0.04
Vitamin B12 (mcg)	NR <sup>c</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00		0.01
Folic acid (mcg)	NR <sup>c</sup>	38.89	8.55	0.46	0.00		0.00
Dietary folate equivalents (mcg)	NR <sup>c</sup>	0.084	0.15	NR <sup>c</sup>	0.00		9.01
							0.15

a Data from reference (46). b Portion size without added flavoring ingredients. c NR=Not Reported. d Raw to cooked conversion factor. Equivalent to 30 g portion size. Data from reference (43). e Nutrient content per final portion size after addition of flavoring ingredients f Estimated nutrient increase with the addition of serving flavoring ingredients. g Estimated RDA coverage for an average adult. Data from reference (48).

Sanlier et al., 2019 (45) summarize the wide range of health and nutrition benefits attributed to fermented foods indicating that such effects are due primarily to the bacterial synthesis of vitamins, amino acids, bioactive peptides, and other bioactive substances generated during the fermentation process. Several microorganisms participate in this process, and most health effects are attributed to LAB (42).

The dietary guidelines for El Salvador (54) recommend consuming between 10–12 daily portions of cereals for an average individual, therefore the consumption of a cup (250 g, plus added flavoring ingredients) of “Atol shuco” represents a good alternative for a healthy and nutritious diet.

## Final Remarks

“Atol shuco” is a traditional nutritious hot beverage whose preparation and consumption need to be preserved. It provides energy and essential nutrients, as well as bioactive compounds derived from the fermentation process that contribute to the nutrition and health of consumers. The addition of ingredients to the “Atol shuco” complements and enhance the nutritional value of the beverage as consumed, particularly of protein, energy, dietary fiber and some micronutrients as phosphorus and iron. Of particular interest is the increase in better quality protein due the generation of essential amino acids by corn fermentation and the complementarity contribution of bean protein. Furthermore, the synergism of the chemical composition of “Atol shuco” ingredients, the microbiota and the bioactive compounds generated by the fermentation process have potential to contribute with the prevention of chronic conditions such as obesity, diabetes, and cardiovascular disease. However, direct scientific information about the phytochemistry, microbiology, and health implication of “Atol shuco” is limited. Research is needed to determine the phytochemical composition, including antioxidant capacity, flavonoid compounds and other metabolites of the diverse corn and bean varieties, as well as of other staple crops, consumed in the country. The microbiota involved in the fermentation of “Atol shuco” also needs to be studied in more depth using molecular techniques to identify specific beneficial bacteria species and other microorganisms, including those that may represent a toxicological risk to consumers. Current information indicates that “Atol shuco” is safe provided appropriate hygiene measures are taken during processing, handling and final consumption, particularly assuring proper handling of the added flavoring ingredients. As a public health measure, it would be important to know the safety of this popular product under different sanitary marketing conditions where environmental hygiene may not be the best.

Because of its ancestral and cultural heritage, “Atol shuco” is a nostalgic food that can be incorporated as part of the growing international market trend of Hispanic foods, particularly in the United Sta-

tes and Canada (55). There are millions of Salvadorians and Central Americans residing in foreign countries that would love to consume “Atol shuco” in their place of residence. This represents an opportunity to improve the technology to industrialize and commercialize this product for export, also bringing a financial benefit for the country.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge M.S. Gabriel Cerén, National History Museum of El Salvador, for his botanical advice and Lic. Raúl Magarín, Office of Scientific Research (SIC-UES) of the University of El Salvador for his photography work.

The participation in the laboratory work of students Brenda Estefani Hernández Ramos, Gricelda Abigail García Rivera, Enrique Stanley Argumedo Ochoa and José Vicente Ventura Cruz is appreciated.

### **References**

1. Galinat, W. C. The origin of maize. *Annu Rev Genet* 1971, 5, 447–478. DOI: 10.1146/ annurev.ge.05.120171.002311. PMID: 16097663.
2. Cortéz-Azenon, M. de J.; Ayala-Durán, C. Contenido de proteína, hierro, zinc en maíces criollos salvadoreños. *Realidad y Reflexión* 2020, 20, 25–35. DOI: 10.5377/ryr.v51i0.9842 (accessed 2021-10-09).
3. Pérez-Cataluña, A.; Elizaquível, P.; Carrasco, P.; Espinosa, J.; Reyes, D.; Wachter, C.; Aznar, R. Diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Atole agrio, a traditional maize-based fermented beverage from South-Eastern Mexico, analysed by high throughput sequencing and culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2018, 111, 385–399. DOI: 10.1007/s10482-017-0960-1. Epub 2017 Oct 22. PMID: 29058140.

4. Chaves-López, C.; Serio, A.; Delgado-Ospina, J.; Rossi, C.; Grande-Tovar, C. D.; Paparella, A. Exploring the bacterial microbiota of Colombian fermented maize dough “Masa Agria” (Maiz Añejo). *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1168. DOI:10.3389/fmicb.2016.01168. PMID: 27524979; PMCID: PMC4965452
5. Bassi, D.; Orrù, L.; Cabanillas Vasquez, J.; Cocconcelli, P. S.; Fontana, C. Peruvian chicha: A Focus on the microbial populations of this ancient maize-based fermented beverage. *Microorganisms* 2020, 8, 93. DOI: 10.3390/microorganisms8010093. PMID: 32284502; PMCID: PMC7022331.
6. Morataya-Zetino, F. H.; Panameno-Zarate, F. E.; Viera-Amaya, M. C. Evaluación del valor nutricional de bebidas no-alcohólicas típicas salvadoreñas. Monografía de Especialización, Universidad Dr. José Matías Delgado, San Salvador, 2011. <https://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/TESIS/04/AGI/ADTESME0001265.pdf> (accessed 2021-10-09)
7. ITCA-FEPADE (Escuela Especializada en ingeniería); Cultura y cocina en la ruta de las flores. Santa Tecla, El Salvador, 2016. <https://core.ac.uk/download/pdf/47266261.pdf> (accessed 2021-10-09).
8. FUNDESYRAM (Fundación para el Desarrollo Socioeconómico y Restauración Ambiental). Recuperación de saberes y sabores salvadoreños. San Salvador, El Salvador. <https://drive.google.com/file/d/13ilha-9QKutVEBh2Xi0-T6DPQcwmeqsh/view?usp=sharing> (accessed 2021-10-09).
9. Parada-Rosales S. I.; Hernández-Quinteros B. G. Historia de las tradiciones populares de la ciudad de San Miguel. Tesis, Universidad de El Salvador, 2020. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/23576/1/HISTORIA%20DE%20LAS%20TRADICIONES%20POPULARES%20DE%20LA%20CIUDAD%20DE%20SAN%20MIGUEL.pdf> (accessed 2021-10-09).

10. Cui, L.; Li, D. J.; Liu, C. Q. Effect of fermentation on the nutritive value of maize. *Inter. J. Food Sci Tech.* 2012, 47, 755–760. <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2621.2011.02904.x>
11. Chaves-López, C.; Rossi, C.; Maggio, F.; Paparella, A.; Serio, A. Changes occurring in spontaneous Maize fermentation. An Overview. *Fermentation* 2020, 6, 36. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation6010036>.
12. Mohamed, S. Functional Foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension, and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends Food Sci. Tech.* 2014, 35, 114–128. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.11.001.
13. Zhang, Q.; Gonzalez de Mejia, E.; Luna-Vital, D.; Tao, T.; Chandrasekaran, S.; Chatham, L.; Juvik, J.; Singh, V.; Kumar, D. Relationship of phenolic composition of selected purple maize (*Zea mays* L.) genotypes with their anti-inflammatory, anti-adipogenic and anti-diabetic potential. *Food Chem.* 2019, 289, 739–750. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.03.116. Epub 2019 Mar 23. PMID: 30955674.
14. Larios, C.; Cornejo, M. E.; Mancía Alfaro, M. A.; Miramar, J. Rescate de los elementos de carácter etnográfico propios de San Bartolomé Perulapía y su vinculación con el turismo. Trabajo de graduación. Universidad Tecnológica de El Salvador, 2018. <http://biblioteca.utec.edu.sv/siab/virtual/tesis/941001116.pdf> (accessed 2021-10-09).
15. López-Avila, L. A.; Gil-Leiva, L. E.; Pérez-Reyes, D. A.; Rafael-Cardona, P. M.; Rodas-Torres, J. M.; Sacasa-Solorzano, R.; Zambrano-Ramirez, S. M. Compendio de recetas, técnicas ancestrales y modernas de la gastronomía Guatemalteca; Universidad Galileo; 2017. [http://biblioteca.galileo.edu/tesario/bitstream/123456789/668/1/2017-Tlgac-001\\_varios.pdf](http://biblioteca.galileo.edu/tesario/bitstream/123456789/668/1/2017-Tlgac-001_varios.pdf) (accessed 2021-08-14).

16. Mendoza-Mendoza, C.; Mendoza-Castillo, M.; Delgado-Alvarado, A.; Sánchez-Ramírez, F. J.; Kato-Yamakake, T. Anthocyanins content in the kernel and corncob of Mexican purple corn populations. *Maydica* 2020, 65, 1–10. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/2167/1304> (accessed 2021-08-14).
17. Paulsmeyer, M.; Juvik, J. Functional characterization of an anthocyanin dimalonyltransferase in maize. *Molecules* 2021, 26, 2020. DOI: 10.3390/molecules26072020.
18. MINECO, OSARTEC, MIFIC, SIC, MEIC. Reglamento técnico centroamericano 67.04.54:10 para alimentos y bebidas procesadas; Aditivos alimentarios; 2012; pp 185–93. [http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/reglamentos/ANEXO\\_RES\\_283\\_RTCA\\_ADITIVOS\\_ALIMENTARIOS\\_COMIECO.pdf](http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/reglamentos/ANEXO_RES_283_RTCA_ADITIVOS_ALIMENTARIOS_COMIECO.pdf) (accessed 2021-08-12).
19. Hu, X.; Liu, J.; Li, W.; Wen, T.; Li, T.; Guo, X. B.; Liu, R. H. Anthocyanin accumulation, biosynthesis and antioxidant capacity of black sweet corn (*Zea mays* L.) during kernel development over two growing seasons. *J. Cereal Sci.* 2020, 95, 103095. DOI: 10.1016/j.jcs.2020.103065.
20. Navarro, A.; Torres, A.; Fernández-Aulis, F.; Peña, C. Bioactive compounds in pigmented maize. *Corn-production and Human Health in Changing Climate*; IntechOpen Book Series, 2018; pp 69-91.
21. Sheng, S.; Li, T.; Liu, L.; RuiHai, L. Corn phytochemicals and their health benefits. *Food Sci. Hum. Well.* 2018, 7, 185–195. DOI: 10.1016/j.fshw.2018.09.003.
22. Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* 2017, 61, 1361779. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779.

23. Zhang, Z.; Yang, L.; Ye, H.; Du, X. F.; Gao, Z. M.; Zhang, Z. L. Effects of pigment extract from black glutinous corncob in a high-fat-fed mouse model of hyperlipidemia. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 230, 943–946. DOI: 10.1007/s00217-010-1242-6.
24. Martínez-Martínez, R.; Vera-Guzmán, A. M.; Chávez-Servia, J. L.; Bolaños, E. N. A.; Carrillo- Rodríguez, J. C.; Pérez-Herrera, A. Bioactive compounds and antioxidant activities in pigmented maize landraces. *Interciencia* 2019, 44, 549–556.
25. Lopez-Martinez, L. X.; Oliart-Ros, R. M.; Valerio-Alfaro, G.; Lee, C. H.; Parkin, K. L.; Garcia, H. S. Antioxidant activity, phenolic compounds, and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Sci. Technol.* 2009, 42, 1187–1192. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.10.010.
26. Lao, F.; Sigurdson, G. T.; Giusti, M. M. Health benefits of purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017, 16, 234–246. DOI: 10.1111/1541- 4337.12249.
27. Azenón, M. J. C.; Durán, C. A. Protein, iron and zinc content in Salvadorian native maize. *Reality and Reflection* 2020, 51, 25–35.
28. Standley, P. C.; Calderón, S. Lista preliminar de las plantas de El Salvador, 2 ed.; Imprenta Nacional: El Salvador, 1941; pp 1-274. <http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/1558/1/Lista%20Preliminar%20de%20las%20Plantas.pdf>.
29. 29. Chávez-Mendoza, C.; Sánchez, E. Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): implications for health. *Molecules* 2017, 22, 1360. DOI: 10.3390/molecules22081360.
30. Chávez-Santoscoy, R. A.; Gutierrez-Urbe, J. A.; Granados, O.; Torre-Villalvazo, I.; Serna- Saldivar, S. O.; Torres, N.; Palacios-González, B.; Tovar, A. R. Flavonoids and saponins ex-



- tracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *Br. J. Nutr.* 2014, 112, 886–899. DOI: 10.1017/S0007114514001536.
31. Pérez, R. M. G. Review of *Cucurbita pepo* (Pumpkin) its phytochemistry and Pharmacology. *Med. Chem.* 2016, 6, 1. DOI: 10.4172/2161-0444.1000316.
  32. Matus, Z.; Molnár, P.; Szabó, L. G. Main carotenoids in pressed seeds (*Cucurbitae semen*) of oil pumpkin (*Cucurbita pepo convar. pepo var. styriaca*). *Acta Pharm. Hung.* 1993, 63, 247–256.
  33. Rabrenović, B. B.; Dimić, E. B.; Novaković, M. M.; Tešević, V. V.; Basić, Z. N. The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *Food Sci. Technol.* 2014, 55, 521–527. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.10.019.
  34. Tanaka, R.; Kikuchi, T.; Nakasuji, S.; Ue, Y.; Shuto, D.; Igarashi, K.; Okada, R.; Yamada, T. A novel 3 $\alpha$ -p-nitrobenzoylmultiflora-7:9(11)-diene-29-benzoate and two new triterpenoids from the seeds of Zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Molecules* 2013, 18, 7448–7459. DOI: 10.3390/molecules18077448.
  35. Li, W.; Koike, K.; Tatsuzaki, M.; Koide, A.; Nikaido, T. Cucurbitosides F-M, acylated phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita pepo*. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1754–1757. DOI: 10.1021/np050328b.
  36. Antonio, A. S.; Wiedemanna, L. S. M.; Veiga, J. V. F. The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC Advances* 2018, 8, 25767–25784. DOI: 10.1039/C8RA02067A.
  37. Ayala, J. C. G. *Botánica Medicinal Popular (Etnobotánica Medicinal de El Salvador)*, 2nd ed.; Tecnoimpresos S.A. de C.V.: San Salvador, El Salvador, 1994; Vol. 2., pp 1-189.

38. Giuffrida, D.; Dugo, P.; Torre, G.; Bignardi, C.; Cavazza, A.; Corradini, C.; Dugo, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* 2013, 140, 794–802. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.060.
39. Olatunjii, T. L.; Afolayan, A. J. Comparative quantitative study on phytochemical contents and antioxidant activities of *Capsicum annum* L. and *Capsicum frutescens* L. *Sci. World J.* 2019, 2, 1–13. DOI: 10.1155/2019/4705140.
40. Da Silva, N.; Taniwaki, M. H.; Junqueira, V. C.; Silveira, N.; do Nascimento, M. S.; Gomes, R. A. R. Microbiological examination methods of food and water: A laboratory manual; CRC Press: London, U.K., 2013; <https://doi.org/10.1201/b13740>.
41. St-Germain, G.; Summerbell, R. Identifying Fungi: A Clinical Laboratory Handbook; Star Publishing Company, 2011.
42. Mathur, H.; Beresford, T. P.; Cotter, P. D. Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients* 2020, 12, 1679. DOI: <http://doi.org/10.3390/nu12061679>.
43. Olsen, A.; Halm, M.; Jacobsen, M. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (Kenkey) and their interaction during fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 1995, 79, 506–512. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03170.x>.
44. Adibiyi, J. A.; Kayitesi, E.; Adebo, O. A.; Changwa, R.; Njobe, P. B. Food fermentation and mycotoxin detoxification: An Africa perspective. *Food Control* 2019, 106, 106731. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106731>.
45. Şanlıer, N.; Başar, G. B.; Ceyhun, A. S. Health benefits of fermented foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, 59, 506–27. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>.

46. INCAP. Tabla de Composición de Alimentos de Centro América; Segunda, Guatemala; 2012; 128 p. <http://www.incap.int/mesocaribefoods/dmdocuments/tablacalimentos.pdf> (accessed 2021-08-30).
47. Murillo, S.; Ulate, E. Composición de alimentos y tabla de pesos para Costa Rica; Costa Rica, 1984; p. 47. <https://www.binasss.sa.cr/opac-ms//media/digitales/Tabla%20de%20composici%C3%B3n%20de%20alimentos%20y%20pesos%20para%20C.R..pdf> (accessed 2021-07-15).
48. INCAP. Recomendaciones Dietéticas Diarias, 5th ed.; Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, Editor; Guatemala, 2012-05-31. <http://bvssan.incap.int/wp-content/uploads/2021/08/Publicaciones-INCAP-venta-3jun2021.pdf> (accessed 2021-08-30).
49. Escobar-Mejia, P. M. Determinación de la calidad proteica y aceptabilidad de tres formulaciones de tortilla de maíz y frijol tipo “snack”; <https://docplayer.es/34738513-Determinacion-de-la-calidad-proteica-y-aceptabilidad-de-tres-formulaciones-de-tortillas-de-maiz-y-frijol-tipo-snack.html> (accessed 2021-09-12).
50. Johnston, C. I.; Singleterry, R.; Reid, C.; Sparks, D.; Brown, A.; Baldwin, B.; Ward, S. H.; Williams, W. P. The fate of aflatoxin in corn fermentation. *Nat. Resour.* 2012, 3, 126–36. DOI: 10.4236/nr.2012.33017.
51. Rauda, H. J. R.; Cruz-Salmeron, T. A.; Martinez-Lopez, R. I. Aflatoxinas y ocratoxinas totales en maíz para autoconsumo de agricultores de subsistencia, de El Salvador; AUPRIDES 2015, 126-136. <https://www.researchgate.net/publication/291344497> (accessed 2021-09-12).
52. Siyuan, S.; Tong, L.; Liu, R. H. Corn phytochemicals and their health benefits. *Food Sci Hum Wellness* 2018, 7, 185–95. DOI: 10.1016/j.fshw.2018.09.003.

53. Luna-Vital, D.; Luzardo-Ocampo, I.; Cuellar-Nuñez, M.; Loarca-Piña, G.; Gonzalez de Mejía, E. Maize extract rich in ferulic acid and anthocyanins prevents high-fat-induced obesity in mice by modulating SIRT1, AMPK and IL-6 associated metabolic and inflammatory pathways. *J. Nutr. Biochem.* 2020, 79, 108343. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2020.108343.
54. MINSAL. Guía de alimentación y nutrición de la familia salvadoreña por grupos etareos; San Salvador, 2009; p 59. [http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/guia/Guia\\_alimentacion\\_etareos.pdf](http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/guia/Guia_alimentacion_etareos.pdf) (accessed 2021-07-12).
55. Mejía, L. A. Opportunities and challenges for the marketing of Hispanic foods in the United States. In *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*; Tunick, M. H., González de Mejía, E., Eds; ACS Symposium Series 1109; American Chemical Society: Washington, DC, 2012; pp 1-9.

## **Acs / rightslink terms & conditions**

### **Introduction**

The publisher for this copyrighted material is the American Chemical Society. By clicking “accept” in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. (“CCC”), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at

<<http://myaccount.copyright.com>>).

### **Limited license**

Publisher hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one- time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process. Note that if credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source and not the ACS.

### **Geographic rights: scope**

Licenses may be exercised anywhere in the world.

### **Reservation of rights**

Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC’s Billing and Payment terms and conditions.

### **Portion rights statement: disclaimer**

If you seek to reuse a portion from an ACS publication, it is your responsibility to examine each portion as published to determine

whether a credit to, or copyright notice of, a third party owner was published adjacent to the item. You may only obtain permission via RightsLink to use material owned by ACS. Permission to use any material published in an ACS publication, journal, or article which is reprinted with permission of a third party must be obtained from the third party owner. ACS disclaims any responsibility for any use you make of items owned by third parties without their permission.

## **Revocation**

The American Chemical Society reserves the right to revoke a license for any reason, including but not limited to advertising and promotional uses of ACS content, third party usage, and incorrect figure source attribution.

## **License contingent on payment**

While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

## **Copyright notice: disclaimer**

You must include the following copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material: “Reprinted (“Adapted” or “in part”) with permission from REFERENCE CITATION. Copyright YEAR American Chemical Society.”

## **Warranties: none**

Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

## **Indemnity**

You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

## **No transfer of license**

This license is personal to you or your publisher and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher’s written permission.

## **No amendment except in writing**

This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher’s behalf).

## **Objection to contrary terms**

Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and

conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

## **Jurisdiction**

This license transaction shall be governed by and construed in accordance with the laws of the District of Columbia. You hereby agree to submit to the jurisdiction of the courts located in the District of Columbia for purposes of resolving any disputes that may arise in connection with this licensing transaction.

Other conditions: v1.3



## Capítulo 4. Educación Superior y Ciencias Sociales



# Factores que influyen en la elección de una carrera en atención primaria entre los estudiantes de medicina en América Central

Eduardo Benjamín Puertas<sup>1</sup>; Rafael Antonio Orellana<sup>2</sup>; Brian Erazo Muñoz<sup>3</sup>; Jorge Arturo Jiménez<sup>4</sup>; Isamara Gilmiani Medina Quiroz<sup>5</sup>; Lucia Terrón<sup>6</sup>; Alexandre Florencio<sup>7</sup>; Hilda M. Leal<sup>7</sup>; Juan José Vindell<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Organización Panamericana de la Salud, San Salvador, El Salvador. Benjamín Puertas, puertab@paho.org; <sup>2</sup>Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador; <sup>3</sup>Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras; <sup>4</sup>Centro de Desarrollo Estratégico e Información en Salud y Seguridad Social, San José, Costa Rica; <sup>5</sup>Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, Nicaragua; <sup>6</sup>Ejercicio Profesional Supervisado Rural, Ciudad de Guatemala, Guatemala; <sup>7</sup>Organización Panamericana de la Salud, Managua, Nicaragua.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-No-Derivs 3.0 IGO, que permite su uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el trabajo original se cite de la manera adecuada. No se permiten modificaciones a los artículos ni su uso comercial. Al reproducir un artículo no debe haber ningún indicio de que la OPS o el artículo avalan a una organización o un producto específico. El uso del logo de la OPS no está permitido. Esta leyenda debe conservarse, junto con la URL original del artículo.

Forma de citar: Puertas EB, Orellana RA, Muñoz BE, Jiménez JA, Medina Quiroz IG, Terrón L et al. Factores que influyen en la elección de una carrera en atención primaria entre los estudiantes de medicina en América Central. Rev Panam Salud Publica. 2020;44:e94. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.94>

## Abstract

**Objectives.** To identify the preferred specialties, salary perception and other factors that influence the choice of a career in primary care among last-year medical students or social service students in Central America.

**Methods.** A cross-sectional, multicenter study using a survey that investigated demographic information, preferred specialty, salary perception, and other factors that influence the choice of a specialty.

**Results.** A total of 1 722 students from 31 universities participated and identified as future specialties: surgery (11.7 %), gynecology/obstetrics (10.3 %), pediatrics (9.9 %) and internal medicine (6.6 %). General medicine was preferred by 3.8 % and family medicine by 1.1 %. On grouping them, the greatest interest was observed for medical specialties (49.7 %), followed by surgical specialties (31.7 %). Primary care registered an interest of 17.1 %. Surgical specialties were perceived as having the highest income (USD 36 000); primary care was perceived as having the lowest income (USD 24 000). Income (23.6 %), future work (19.7 %) and “making a difference in people” (8.9 %) were the main factors involved in the choice. “Working with people with low access” was significantly associated with preference for primary care. Preference for other specialties was influenced by “perceived prestige” and “enjoying life” ( $P < 0.05$ ). Most participants who chose primary care were studying at a public university ( $P < 0.05$ ), highlighting the role of public institutions of higher education.

**Conclusions.** There is a combination of facilitating factors and barriers that affect the low interest in primary care careers. There is a need for strategies from academia and the government sector, as well as the definition of public policies that support the choice of primary care.

**Keywords:** Primary health care; specialization; health workforce; Central America.

## Resumen

**Objetivos.** Identificar las especialidades preferidas, la percepción salarial y los factores que influyen en la elección de una carrera en atención primaria en los estudiantes de último año de medicina o en servicio social de América Central.

**Métodos.** Estudio multicéntrico de corte transversal con aplicación de una encuesta que investigó la información demográfica, la especialidad preferida, la percepción salarial y otros factores que influyen en la elección de la especialidad.

**Resultados.** Participaron 1 722 estudiantes de 31 universidades que identificaron como futuras especialidades: cirugía (11,7 %), ginecología/obstetricia (10,3 %), pediatría (9,9 %) y medicina interna (6,6 %). Medicina general alcanzó 3,8 % y medicina familiar 1,1 %. Al agruparlas el mayor interés fue para las especialidades médicas (49,7 %), seguido de las quirúrgicas (31,7 %). Atención primaria registró un interés del 17,1 %. Las especialidades quirúrgicas fueron percibidas como de mayor ingreso (USD 36 000); atención primaria fue percibida como la de menor ingreso (USD 24 000). El ingreso (23,6 %), el trabajo a futuro (19,7 %) y “hacer una diferencia en las personas” (8,9 %) fueron los principales factores involucrados en la elección. “Trabajar con personas con escaso acceso” se asoció de manera significativa con la preferencia por la atención primaria. La preferencia por otras especialidades fue influenciada por el “prestigio percibido” y “disfrutar la vida” ( $P < 0,05$ ). La mayoría de los participantes que eligieron la atención primaria provenían de una universidad pública ( $P < 0,05$ ), lo que pone de relieve el papel de las instituciones estatales de educación superior.

**Conclusiones.** Existe una combinación de factores facilitadores y de barreras que inciden en el desinterés hacia las carreras de atención primaria. Se requiere de estrategias desde la academia y el sector gubernamental, así como la definición de políticas públicas, que favorezcan la elección de la atención primaria.

**Palabras clave.** Atención primaria de salud; especialización; fuerza laboral en salud; América Central.

La atención primaria es la provisión de servicios de salud integrados y accesibles por profesionales eficientes en la cobertura de la mayoría de las necesidades de salud de las personas, que desarrollan una relación continuada con sus pacientes, y que realizan su práctica dentro del contexto de la familia y la comunidad (Instituto de Medicina, 1978).

Los países con mayor proporción de médicos de atención primaria respecto de su población obtuvieron mejores resultados de salud, incluyendo tasas más bajas de mortalidad general (1,2). En EE.UU. los pacientes que identificaron a los médicos de atención primaria como sus fuentes habituales de atención tuvieron menores tasas de mortalidad en menores de cinco años, en comparación con los pacientes que identificaron a médicos especialistas (3). En Inglaterra, cada médico de cabecera adicional por cada 10 000 habitantes se asoció con una disminución del 5 % de la mortalidad (4). La presencia de médicos de atención primaria tuvo un impacto positivo en zonas con alta desigualdad social en México, donde la prestación de atención primaria tuvo un importante efecto sobre la reducción de la mortalidad infantil (5).

Varios países del mundo están experimentando una escasez de personal de salud, en parte debido a la migración y la distribución inequitativa del personal de salud entre los centros urbanos y las zonas rurales. En 2008, en EE.UU. sólo el 37 % de los médicos practicaba atención primaria a pesar de que el 56 % de las visitas a los consultorios médicos eran aptas para este tipo de atención, y un gran porcentaje de la población vivía en áreas con escasez de atención primaria (6). La falta de médicos de familia afecta más a las zonas rurales de los países en desarrollo (7). En los países en desarrollo, las intenciones de carrera de los estudiantes de medicina no están alineadas con las necesidades de los sistemas nacionales de salud, lo que se evidencia en las especialidades que eligen. Los planes de estudio en algunas escuelas de medicina están fuera del contexto de las realidades de las comunidades (8,9).

La escasez de médicos de atención primaria puede explicarse porque los estudiantes de medicina no eligen esta especialidad, los médicos de atención primaria no satisfacen las demandas de una población creciente, y cada vez hay tiempos de espera más largos y menos citas oportunas con el médico (10). Existen varias barreras que explican este fenómeno, como los menores ingresos de la atención primaria en relación con las especialidades (11-19), el bajo prestigio experimentado por las profesiones de atención primaria (13,18-20), y algunos aspectos relacionados con la formación en las escuelas de medicina. En estas, la atención primaria está reflejada de manera insuficiente en los planes de estudio, los estudiantes carecen de exposición a médicos de familia, existe una percepción negativa de los médicos de familia, y prevalece una cultura negativa hacia la atención primaria de la salud (16, 21,22).

Sólo un tercio de los estudiantes de medicina de Canadá estaban interesados en ingresar en un programa de medicina familiar (23). La proporción entre médicos generales y especialistas en Chile disminuyó de 8 generalistas por cada 10 especialistas en 1996, a 6 por cada 10 en 2004 (24). En México, la proporción de médicos generales era de 24 %, y apenas 8 % eran médicos de familia (25). En Honduras, apenas el 8 % de los médicos que iniciaban el servicio social señaló que seguiría una carrera relacionada con la atención primaria (26), y de ellos apenas el 0,9 % se interesó en la medicina familiar. Los factores que más incidieron en la elección de carrera fueron hacer una diferencia en la vida de las personas (23,5 %) y el potencial de ingreso económico (13,1 %). Al finalizar el servicio social, el factor que más incidió en los médicos en Honduras fue el potencial de ingreso económico (23,3 %) (27).

El fortalecimiento de programas rurales, el rediseño curricular, el fomento de aplicaciones de estudiantes de sector rural, y las mentorías y tutorías con médicos familiares son alternativas utilizadas por las facultades de medicina de varios países para fomentar la elección de una carrera en atención primaria (19, 21, 33). La escasez de médicos de atención primaria debe ser cuantificada y proyectada hacia el futuro para conocer su impacto y sus consecuencias y para

plantear alternativas de solución, pero la planificación y proyección de las necesidades son circunscritas a la perspectiva de las entidades formadoras y proveedoras de servicios de salud. Se necesita más evidencia que permita conocer y actuar sobre los elementos que inciden en la elección de atención primaria.

Este estudio busca identificar las especialidades preferidas, la percepción salarial y los factores que influyen en la elección de una carrera en atención primaria en estudiantes de último año de medicina o en servicio social de América Central.

## **Métodos**

Estudio multicéntrico de corte transversal con estudiantes de último año de medicina o en servicio social de Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua, que investigó cuatro áreas: información demográfica, especialidad preferida, percepción salarial y factores que influyen en la elección de la especialidad. Se seleccionó a estudiantes de último año o en servicio social ya que, por estar al final de la formación, sus intenciones podrían reflejar con mayor certeza la elección final. La encuesta se adaptó del instrumento elaborado por la Universidad de Alberta, traducido al español para el piloto en Honduras.<sup>1</sup>

Se realizó una validación de contenido a cargo de los equipos de investigación de cada país, conformados por académicos, expertos de instituciones participantes, incluyendo asesores de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Los participantes calificaron la importancia percibida de 28 factores que inciden en la elección mediante una escala de Likert. La encuesta se realizó de manera presencial en El Salvador y virtual en los otros cuatro países entre mayo y septiembre de 2019. En El Salvador se realizó en las sedes de las universidades participantes, mientras que en Costa Rica, Guatemala y Honduras se utilizaron Google Forms®, y en Nicaragua Question

---

1 El instrumento empleado está disponible mediante solicitud a los autores



Pro°. Para la percepción salarial, el tipo de cambio a USD según los bancos centrales de los países participantes fue: Honduras (24,34 lempiras, 15 de abril 2019), Nicaragua (32,8489 córdobas, 29 abril), Costa Rica (573,220 colones, 3 de junio), Guatemala (7,4995 quetzales, 10 de septiembre 2019).

El análisis de los datos obtenidos durante el estudio incluyó métodos descriptivos e inferenciales y se utilizó el programa SPSS versión 24 (IBM Corporation). Se calcularon distribuciones de frecuencia y porcentajes; el análisis estadístico incluyó chi cuadrado. Para el análisis multivariado se utilizó el análisis factorial para identificar los factores que tienen una asociación con la elección de la atención primaria, previa la aplicación de la prueba de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para comprobar si era factible el análisis factorial. Para identificar las diferencias entre determinadas variables se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La significación se estableció en  $P < 0,05$ .

Las opciones de carrera fueron tomadas del Servicio Canadiense de Pereo de Residentes y adaptadas a las especialidades aprobadas por los colegios médicos de los países participantes. Fueron clasificadas como de atención primaria (medicina general, medicina familiar, pediatría y salud pública), medicina de emergencia (medicina de emergencia y cuidados intensivos), especialidad quirúrgica (cirugía general y de especialidad, cirugía plástica, oftalmología, traumatología y ortopedia, otorrinolaringología, urología) o especialidad clínica (anestesiología, cardiología, dermatología, endocrinología, enfermedades infecciosas y tropicales, especialidad pediátrica no quirúrgica, gastroenterología, geriatría, ginecología y obstetricia, inmunología y alergia, medicina física y rehabilitación, medicina interna, nefrología, neumología, neurología, oncología, patología, psiquiatría, radiología e imagen, reumatología).

El protocolo recibió aprobación del Comité de Ética de la OPS/OMS en Washington DC y de los comités de ética de cada país: CEIB-UNAH (Honduras), CENDEISS-CCSS (Costa Rica), Comité Nacional Ética del Ministerio de Salud Pública (Guatemala), CEIB-UNAN León (Nicaragua), CNEIS (El Salvador). Se obtuvo el consentimiento

informado por vía física y electrónica y se garantizó el anonimato de los participantes utilizando códigos numéricos en lugar de nombres.

## **Resultados**

En la encuesta participaron 1 722 estudiantes de último año de medicina o en servicio social provenientes de 31 universidades y subsedes de cinco países de América Central: El Salvador (650 participantes), Nicaragua (383), Honduras (308), Guatemala (291) y Costa Rica (90). El número de participantes representó el 57 % del universo de estudiantes de ese nivel en la región. La mayoría (63,2 %) pertenecía a universidades públicas y una tercera parte (36,2 %) a universidades privadas. Estaban realizando el servicio social 1 428 participantes (82,9 %) y 291 (16,9 %) cursaban el último año de la carrera de medicina.

Más de la mitad de los participantes fueron mayores de 25 años (51,7 %); la mayoría fue de sexo femenino (58 %) y se autodefinió como mestizo (85,7 %). Los participantes provenientes de grupos étnicos y afrodescendientes sumaron 4,7 %; en estos grupos se mantuvo la predominancia del sexo femenino. La mayoría de los estudiantes señalaron que estaban solteros (92,6 %) y sin hijos (90,8 %), aunque 62,9 % pensaba tener hijos a futuro. La mayoría provenía de áreas urbanas (83,3 %), con un 3,1 % de encuestados/as de barrios marginales. Apenas el 1,9 % y el 0,5 % residía en aldeas/caseríos o lugares remotos/aislados, respectivamente. El 91,4 % de participantes respondieron que no tenían progenitores que hubieran ejercido como médico.

## **Especialidades preferidas**

Las principales especialidades identificadas como futuras carreras fueron: cirugía (11,7 %), ginecología y obstetricia (10,3 %), pediatría (9,9 %), medicina interna (6,6 %). Dermatología (4,3 %), cirugía plástica y geriatría (4,0 %) ocuparon el sexto y séptimo lu-

gar, respectivamente. Medicina general ocupó el octavo lugar (3,8 %), mientras que salud pública (1,9 %) y medicina familiar (1,1 %) obtuvieron pocas respuestas (Cuadro 1). Existieron variaciones por país. La segunda opción de especialidad no varió demasiado, aunque las relacionadas con atención primaria obtuvieron respuestas más significativas.

El estudio identificó diferencias en las preferencias de carrera en los países. Las cuatro especialidades básicas se mantuvieron entre los primeros cinco lugares de preferencia, aunque anestesiología se destacó en Costa Rica, Guatemala y El Salvador (tercer, quinto y décimo puesto, respectivamente), y psiquiatría ocupó el cuarto lugar en Costa Rica, séptimo en Nicaragua y octavo en Honduras. Medicina general fue la carrera preferida en Nicaragua (15,7 %).

Al agrupar las especialidades en categorías se observó más interés en las especialidades médicas (49,7 %), seguido de las quirúrgicas (31,7 %). Atención primaria alcanzó 17,1 %, aunque eliminando pediatría de este grupo el porcentaje se redujo a 11,7 %. Medicina de emergencia fue la preferencia para el 1,6 % de participantes.

**Cuadro 1. Comparación de las especialidades preferidas por subregión, país y clasificación**

Especialidades	América Central n (%) Clasif	Costa Rica n (%) Clasif	El Salvador n (%) Clasif	Guatemala n (%) Clasif	Honduras n (%) Clasif	Nicaragua n (%) Clasif
Cirugía	199 (11,7)	5 (6,0)	96 (15,0) 1	21 (7,2) 4b	29 (9,4) 3b	48 (12,5) 3b
Ginecología	176 (10,3)	8 (9,5)	73 (11,4) 3b	63 (21,6) 1a	31 (10,1) 2	1 (0,3) 17b
Pediatría	168 (9,9)	3 (3,6)	81 (12,7) 2a	40 (13,7) 2a	40 (13,0) 1a	4 (1,0) 14b
Medicina interna	113 (6,6)	6 (7,1)	65 (10,2) 4	13 (4,5) 6b	23 (7,5) 4	6 (1,6) 12b
Traumatología	84 (4,9)	3 (3,6)	30 (4,7) 7b	32 (11,0) 3a	16 (5,2) 6b	4 (1,0) 14b
Dermatología	73 (4,3)	4 (4,8)	28 (4,4) 8b	12 (4,1) 7b	8 (2,6) 11b	21 (5,5) 5a
Cirugía plástica	68 (4,0)	3 (3,6)	31 (4,9) 5a	6 (2,1) 11b	17 (5,5) 5a	11 (2,9) 8b
Geriatría	68 (4,0)	4 (4,8)	8 (1,3) 5b	2 (0,7) 15b	1 (0,3) 18b	53 (13,8) 2a
Patología	58 (3,4)	1 (1,2)	11 (1,7) 13b	2 (0,7) 15b	2 (0,6) 17b	42 (11,0) 4a
Anestesiología	51 (3,0)	5 (6,0)	18 (2,8) 10	15 (5,2) 5a	6 (1,9) 13b	7 (1,8) 11b
Psiquiatría	47 (2,8)	4 (4,8)	11 (1,7) 13b	4 (1,4) 13b	14 (4,5) 8a	14 (3,7) 7a
Atención primaria						
Medicina general	64 (3,8)	0 (0,0)	2 (0,3) 19b	0 (0,0) 35b	2 (0,6) 17b	60 (15,7) 1a
Salud pública	32 (1,9)	0 (0,0)	15 (2,4) 12a	1 (0,3) 16a	2 (0,6) 17a	14 (3,7) 7a
Medicina familiar	19 (1,1)	3 (3,6)	8 (1,3) 14a	3 (1,0) 14a	5 (1,6) 14a	0 (0,0) 35b

a Clasificación por encima que América Central

b Clasificación por debajo que América Central

Fuente: Elaborado por los autores a partir de los datos del estudio.

Cuadro 2. Características de los participantes por categoría de especialización preferida

Especialidades categorizadas					
Demográficas	Atención N (%) (n=283)	Especialidad N (%) (n=525)	Medicina N (%) (n=26)	Especialidad N (%) (n=824)	Total N (%) (n=1 658)
Año cursadoa					
Último año	42 (14,6)	78 (27,2)	10 (3,5)	157 (54,7)	287 (100,0)
Año social	241(17,6)	446 (32,6)	16 (1,2)	665 (48,6)	1 383 (100,0)
Otro	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	2 (66,7)	3 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)
Edad					
< 25 años	144 (17,8)	266 (32,8)	14 (1,7)	386 (47,7)	810 (100,0)
> 25 años	139 (16,4)	259 (30,5)	12 (1,4)	438 (51,7)	848 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)
Sexoa					
Masculino	103 (15,1)	290 (42,5)	14 (2,0)	276 (40,4)	683 (100,0)
Femenino	180 (18,5)	235 (24,1)	12 (1,2)	548 (56,2)	975 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)
Origen étnico					
Blanco	26 (16,6)	50 (31,8)	2(1,3)	79 (50,3)	157 (100,0)
Mestizo	236 (16,7)	461 (32,5)	22(1,6)	698 (49,3)	1 417 (100,0)
Afrodendiente	7 (33,3)	0 (0,0)	0(0,0)	14 (66,7)	21 (100,0)

Grupo étnico	14 (23,3)	12 (20,0)	2 (3,3)	32 (53,3)	60 (100,0)
Otro	0 (0,0)	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	3 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)
Estado civil					
Soltero(a)	258 (16,8)	496 (32,2)	24 (1,6)	762 (49,5)	1 540 (100,0)
Casado/Unión libre	25 (21,9)	28 (24,6)	2 (1,8)	59 (51,8)	114 (100,0)
Separado(a)/Viudo(a)	0 (0,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	3 (75,0)	4 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)
Lugar donde vivió					
Urbano	228 (16,5)	445 (32,2)	20 (1,4)	691 (49,9)	1 384 (100,0)
Rural	55 (20,1)	80 (29,2)	6 (2,2)	133 (48,5)	274 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)
Algún progenitor trabajó como médico					
Sí	22 (15,3)	58 (40,3)	1 (0,7)	63 (43,8)	144 (100,0)
No	261 (17,2)	467 (30,8)	25 (1,7)	761 (50,3)	1 514 (100,0)
Total	283 (17,1)	525 (31,7)	26 (1,6)	824 (49,7)	1 658 (100,0)

a Estadísticamente significativo (P < 0,05)

Fuente: Elaborado por los autores a partir de los datos del estudio.

Las especialidades médicas (56,2 % vs. 40,4 %) y de atención primaria (18,5 % vs. 15,1 %) prevalecieron en la población de sexo femenino. Las especialidades quirúrgicas (42,5 % vs. 24,1%) y de medicina de emergencia (2 % vs. 1,2 %) prevalecieron entre los hombres.

De las características sociodemográficas analizadas, resultaron estadísticamente significativas el año cursado y el sexo ( $P < 0,05$ ), con respecto a las categorías de especialidades. Las especialidades médicas fueron las preferidas por los estudiantes de último año y en servicio social (54,7 % y 48,6 %), especialmente de sexo femenino (56,2 %). (Cuadro2)

El 71 % de los participantes que eligieron la opción de atención primaria provenían de una universidad pública ( $P < 0,05$ ). El 49,6 % de la población encuestada consideró que su elección no era definitiva, comparado con el 39,1 % que sí estaba seguro de su decisión.

## Percepción salarial

La mediana de ingreso anual que esperaban ganar los participantes cinco años después de culminada la carrera fue de USD 30 000. Cerca del 65 % de los encuestados creía que el salario de los médicos generales era inferior a USD 1 500 luego de 2-3 años de haber concluido la carrera, en comparación con el 59 % en el caso de médicos de familia y 29 % en el caso de pediatría. El 19 % que eligió otras especialidades aspiraba a un salario entre USD 3 000 y 4 000, mientras que el 11,6 % aspiraba ganar USD 4 000 o más.

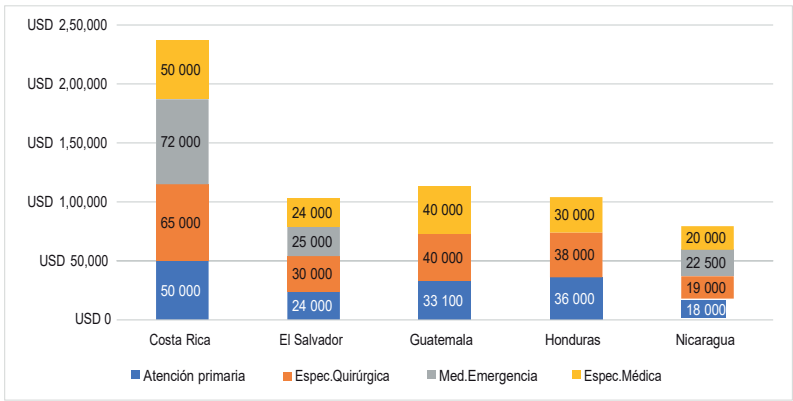
El 36,7 % de las mujeres consideraron que el salario de un médico general era inferior a USD 1 500 en comparación al 27,6 % de los hombres. Similares diferencias se identificaron con relación a medicina familiar (33,4 % vs. 24,8 %).

Las especialidades quirúrgicas tuvieron la percepción de mayor ingreso, con una mediana de USD 36 000, mientras que las carreras de atención primaria tuvieron la percepción más baja con una mediana de USD 24 000, es decir 50 % más baja que las quirúrgicas.

Cuando se agrupó las carreras en “atención primaria” y “otras especialidades”, se identificó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) en la percepción salarial anual.

La percepción salarial más alta se observó en Costa Rica y la más baja en Nicaragua. Las carreras de atención primaria tuvieron una percepción baja en general, aunque en Honduras la mediana fue mayor a la de las especialidades médicas. (Figura 1).

**Figura 1.** Percepción salarial por categoría de especialidad y país, en dólares estadounidenses



*Fuente:* Elaborado por los autores a partir de los datos del estudio USD, dólares estadounidenses (tipo de cambio al 15 de mayo de 2019 según la tabla de Naciones Unidas UN Operational Rates of Exchange).

### Factores influyentes en la elección de carrera

Los participantes consideraron como primer factor más importante: ingreso potencial (23,6 %), potencial de trabajo a futuro (19,7 %), “hacer una diferencia positiva en las personas” (8,9 %), prestigio percibido (8,9 %) y oportunidad por enseñar (8,1 %) (Figura 2). “Potencial de trabajo a futuro” fue seleccionado como el segundo y tercer factor más importante que influyó en la elección de los participantes.



Al analizar por países, los factores más influyentes se mantuvieron, solo cambiando el primer lugar de preferencia. El ingreso potencial fue el factor más importante para los participantes de Guatemala (43 %) y El Salvador (24,7 %), mientras que para Costa Rica (30,2 %) y Nicaragua (20,1 %) fue el potencial de trabajo. En el caso de Honduras, el prestigio percibido de la especialidad (23,7 %) fue el factor más importante.

El factor “oportunidad de trabajar con personas con escaso acceso a la atención” fue significativamente asociado con la preferencia por atención primaria, comparado con otras especialidades combinadas (77,5 % vs 73,0 %,  $P < 0,05$ ). En contraste, los estudiantes que prefirieron otras especialidades fueron más influenciados por el prestigio percibido (68,6% vs 60,9 %,  $P < 0,05$ ) y por la “oportunidad de disfrutar la vida fuera del trabajo” (76,2 % vs 68,7 %).

Cuando todas las especialidades se combinaron, las variables “preferencia por trabajar en una comunidad rural”; “influencia familia, amigos o comunidad”; “oportunidad de trabajar con problemas médicos agudos”; “duración de la residencia; habilidad para utilizar un amplio rango de técnicas y conocimientos en el cuidado del paciente”; “habilidad de dominar un grupo pequeño de técnicas”; “oportunidades para trabajar con independencia profesional”; “desarrollo de relaciones largas con pacientes”; y “oportunidad de disfrutar la vida fuera del trabajo” resultaron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). (Cuadro 3)

La prueba de KMO dio un valor de 0,958, lo que permitió proceder con el análisis factorial. Este identificó cuatro categorías de factores correlacionados, cuyos componentes resultantes se agruparon en: (a) factores institucionales, (b) personales, (c) ingreso y reconocimiento profesional, y, (d) factores comunitarios que influyen la elección de carrera en atención primaria. El nivel de significancia de estas variables estuvo por encima de 0,05, por lo que no se continuó con el modelo de regresión logística.

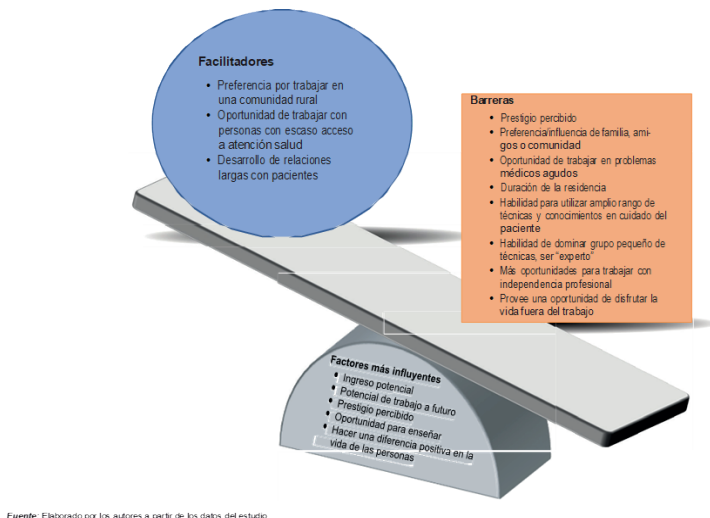
La población participante en el estudio identificó otros factores que incidieron en su elección de carrera. Las 197 opciones de factores fueron agrupadas en las siguientes categorías: ambiente laboral, desarrollo profesional, armonía de vida laboral y personal, accesibilidad. El 25,8 % estuvo relacionado con el ambiente laboral, seguido de armonía de la vida laboral y personal (12,2 %).

## **Discusión**

El grupo participante fue representativo de la población centroamericana en términos de composición demográfica. La mayoría era de origen mestizo y la población afrodescendiente y de otras etnias fue mínima, lo que demuestra el déficit en la formación de médicos provenientes de estos grupos prioritarios. Los participantes provenientes de zonas rurales o remotas fueron muy pocos; esto tiene un impacto negativo en la distribución de personal, dado que la evidencia señala que es más factible que los profesionales de salud que provienen de zonas rurales ejerzan en lugares alejados de los centros urbanos (28, 29). La escasa presencia de participantes de barrios marginales tiene implicaciones similares, y puede estar relacionada con las pocas oportunidades de desarrollo, el bajo nivel de escolaridad y los altos niveles de inseguridad en esas zonas, aunque están más cerca de instituciones de educación superior.

Más de la mitad de los participantes fueron mayores de 25 años y de sexo femenino. La feminización de la carrera médica fue evidente y debe tomarse en cuenta durante la planificación de recursos humanos para la salud. La mayoría de participantes estaba soltera y sin hijos, aunque el 63 % pensaba tenerlos a futuro. Con excepción de la edad, las características demográficas no fueron indicativas de una elección de carreras de atención primaria, aunque la evidencia señala que los estudiantes casados o unidos, mayores de 25 y con niños tenían más interés en escoger atención primaria como carrera (13,30-34).

**Figura 2.** Carrera en atención primaria: facilitadores, barreras y factores más influyentes



*Fuente.* Elaboración por los autores a partir de los datos del estudio.

Las especialidades preferidas fueron cirugía, ginecología/ obstetricia, pediatría y medicina interna, resultados consistentes con los de otros estudios (8, 20, 24, 35-37). Medicina familiar fue de las especialidades menos mencionadas. Llama la atención que dermatología y cirugía plástica se encuentren dentro de las diez principales especialidades, cuando el perfil epidemiológico de la población centroamericana tiene problemas más relacionados con enfermedades transmisibles, no transmisibles y problemas sociales como violencia y accidentes de tránsito. Medicina general ocupó el octavo lugar debido a que los participantes de Nicaragua la ubicaron como primera elección, aunque en los otros países no aparece entre las diez primeras (en Costa Rica fue la última en la clasificación). Las carreras de atención primaria obtuvieron respuestas más significativas como segunda opción, lo que significa que existe un grupo de participantes que no ha descartado la opción de atención primaria como elección.

La ausencia de guardias nocturnas y de llamadas de emergencia pueden haber incidido en la preferencia por dermatología, especial-

mente en participantes de sexo femenino que consideran formar una familia y tener hijos (13, 34, 35).

Las enfermedades infecciosas y tropicales apenas fueron mencionadas como preferencia de carrera, aunque América Central tiene alta incidencia de dengue, chikungunya y zika. Es de destacar el poco interés en medicina de emergencia en una región con altas tasas de accidentes de vehículos a motor y con índices de violencia que sobrepasan los 50 homicidios por 100 000 personas (OMS, 2014). De los países del Triángulo Norte, solo en Honduras la psiquiatría se ubicó dentro de las diez especialidades preferidas. Fue interesante comprobar que la geriatría apareció en la lista principal a diferencia de lo observado en estudios similares en Honduras (26,27), lo que se corresponde con la transición demográfica y el crecimiento de la población adulta mayor en la región.

Cuando se agrupó a las especialidades y carreras en categorías, las especialidades médicas fueron las de mayor interés seguidas de las quirúrgicas y atención primaria. Al desagregar pediatría de la categoría, el interés por la atención primaria se redujo a 11,4 %, un dato más comparable con estudios similares (26,27). El interés por la atención primaria en América Central fue menor que el reportado en estudios efectuados en Canadá, Chile, Alemania, Francia y Estados Unidos (24, 30, 35-37), lo que genera dudas sobre la operacionalización del modelo de salud basado en la atención primaria, que los países participantes destacan como parte del sistema de salud.

**Cuadro 3.** Factores que influyeron en la elección por categoría de especialidad

Categoría de especialidades							
	Atención primaria N (%) (N=283)	Especialidad quirúrgica N (%) (N=525)	Medicina de emergencia N (%) (N=26)	Especialidades médicas N (%) (N=824)	Especialidades combinadas N (%) (N=1 658)	P valor Todas especialidades (Chi2)	P valor AP vs. otras especialidades (Chi2)
Ingreso potencial	203 (72,5)	393 (75,1)	18 (69,2)	599 (73,5)	1 263 (76,2)	0,789	0,592
Prestigio percibido	170 (60,9)	359 (68,5)	18 (69,2)	548 (67,2)	1 137 (68,6)	0,166	0,029a
Oportunidad para enseñar	200 (71,4)	386 (73,7)	19 (73,1)	583 (71,4)	1 231 (74,2)	0,830	0,760
Potencial de trabajo a futuro	256 (91,4)	472 (90,2)	25 (96,2)	730 (89,5)	1 536 (92,6)	0,570	0,431
Preferencia por trabajar en una comunidad rural	89 (31,9)	125 (23,9)	9 (34,6)	248 (30,4)	489 (29,5)	0,033 a	0,190
Preferencia por trabajar en un centro urbano	183 (65,1)	329 (62,0)	18 (69,2)	545 (67,0)	1 110 (67,0)	0,504	0,906
Disponibilidad de plazas de residencia	218 (77,9)	395 (75,4)	23 (88,5)	649 (79,9)	1 334 (80,4)	0,139	0,858
Preferencia/influencia de familia, amigos o comunidad	85 (30,4)	145 (27,8)	8 (30,8)	292 (35,9)	552 (33,3)	0,017 a	0,450
Hacer una diferencia positiva en la vida de las personas	237 (84,9)	452 (86,4)	25 (96,2)	687 (84,3)	1 452 (87,5)	0,302	0,867
Percepción del contenido intelectual de la disciplina	247 (88,2)	447 (85,3)	24 (92,3)	687 (84,3)	1 462 (88,1)	0,293	0,138
Oportunidad para investigar	197 (70,4)	357 (68,3)	22 (84,6)	687 (72,9)	1 215 (73,2)	0,154	0,794
Oportunidad de trabajar en casos altamente desafiantes	227 (81,1)	440 (84,0)	25 (96,2)	666 (81,7)	1 407 (84,8)	0,180	0,473
Oportunidad de trabajar en problemas médicos agudos	223 (79,9)	442 (84,4)	24 (92,3)	645 (79,0)	1 373 (82,8)	0,041a	0,585
Énfasis en la continuidad del cuidado	227 (81,1)	400 (76,3)	20 (76,9)	637 (78,2)	1 320 (79,6)	0,491	0,181

Oportunidad de tratar con una variedad de problemas médicos	233 (83,2)	423 (80,7)	21 (80,8)	651 (79,7)	1 372 (82,7)	0,643	0,230
Exposición temprana a la disciplina	218 (77,9)	395 (75,05)	19 (73,1)	607 (74,5)	1 285 (77,5)	0,714	0,288
Oportunidad de trabajar con personas con escaso acceso a atención salud	217 (77,5)	367 (70,0)	18 (69,2)	571 (70,0)	1 209 (73,0)	0,093	0,011 a
Duración de la residencia	166 (59,3)	290 (55,3)	10 (38,5)	522 (64,0)	1 031 (62,2)	0,002 a	0,771
Habilidad para utilizar un amplio rango de técnicas y conocimientos en el cuidado del paciente	235 (83,9)	472 (90,1)	26 (100,0)	692 (84,8)	1 472 (88,8)	0,004 a	0,154
Habilidad de dominar grupo pequeño de técnicas y ser “experto”	173 (62,0)	372 (71,1)	19 (73,1)	528 (64,7)	1 141 (68,8)	0,026 a	0,086
Una interacción positiva con un médico/profesor de la especialidad	213 (76,1)	405 (77,3)	22 (84,6)	624 (76,5)	1 316 (79,3)	0,778	0,754
Percepción de carga de trabajo relacionada con la especialidad	188 (67,1)	353 (67,4)	16 (61,5)	563 (69,3)	1 169 (70,5)	0,740	0,686
Más tiempo para actividades familiares y de ocio	160 (57,1)	299 (57,1)	14 (53,8)	516 (63,2)	1 036 (62,5)	0,078	0,270
Más oportunidades para trabajar con independencia profesional	221 (78,9)	432 (82,6)	15 (57,7)	669 (81,9)	1 382 (83,3)	0,010a	0,280
Enfatiza la práctica en espacios ambulatorios	169 (60,6)	309 (59,0)	11 (42,3)	517 (63,4)	1 047 (63,1)	0,084	0,827
Horas de trabajo predecibles	193 (58,9)	341 (65,1)	14 (53,8)	565 (69,2)	1 162 (70,0)	0,172	0,607
Provee una oportunidad de disfrutar la vida fuera del trabajo	191 (68,7)	373 (71,3)	17 (65,4)	631 (77,4)	1 263 (76,2)	0,008a	0,034a

La indecisión en 11 % de participantes y el hecho de que sea una probabilidad en la mitad de ellos dejan espacio para motivar a los estudiantes de último año o en servicio social a que aspiren por carreras de atención primaria. El servicio social podría ser el entorno propicio para que el trabajo comunitario y las acciones de promoción, prevención y participación social generen interés en la atención primaria. Sin embargo, el servicio social puede ser desmo-

tivante debido al abandono que sufren los estudiantes, la falta de acceso a insumos y equipos, las pocas opciones de desarrollo profesional y, en muchos casos, la inseguridad.

Las mujeres prefirieron las especialidades médicas y de atención primaria, mientras que en los hombres prevalecieron las especialidades quirúrgicas y de medicina de emergencia. Los resultados fueron significativos en cuanto a la diferencia entre la categoría de especialidades y el sexo de los participantes. La diferencia más marcada entre hombres y mujeres se observó en las especialidades quirúrgicas, que posiblemente siguen siendo un bastión masculino pues requieren muchas horas de dedicación hospitalaria y guardias nocturnas. Los estudios refieren que en el campo de la medicina las mujeres están más interesadas en tener menos horas de trabajo o mayor flexibilidad en comparación con sus colegas masculinos o de menor edad (39,40). Los resultados son comparables a la evidencia encontrada, donde hubo predominancia de mujeres en las carreras de atención primaria como elección preferida (17, 20, 23, 40).

La mayoría de los participantes que eligieron la atención primaria provenían de una universidad pública. Esta diferencia fue significativa y pone de relieve el papel de las instituciones de educación superior estatales como formadoras de recursos humanos con un enfoque integral y con una visión de responsabilidad social.

La percepción salarial de la población encuestada fue menor para la categoría de atención primaria en comparación con las otras especialidades. La percepción más alta se observó en las especialidades quirúrgicas, cuya mediana fue 50 % mayor que la de atención primaria. Estos datos son consistentes con los factores identificados que inciden en la elección, específicamente con el potencial de ingreso. La evidencia corrobora estos resultados (11, 13, 15). En Honduras no existe una diferencia marcada entre los salarios de especialistas y médicos generales, que están regulados por la Ley del Estatuto del Médico Empleado, lo que podría explicar que la percepción salarial para la atención primaria fue más alta que para las especialidades clínicas.

Los participantes consideraron como primer factor más importante al “ingreso potencial”, el “potencial de trabajo”, “hacer una diferencia positiva en las personas” o el “prestigio percibido”. El potencial de trabajo fue seleccionado como el segundo y tercer factor más importante y para Costa Rica fue el factor más decisivo, lo que conduce a considerar que podría estar prevaleciendo aun por encima de las preferencias personales. El factor “oportunidad de trabajar con personas con escaso acceso a la atención en salud” estuvo relacionado con la elección de atención primaria, mientras que los factores “prestigio percibido” y “oportunidad de disfrutar la vida” influyeron en la elección de otras especialidades. Cabe destacar que “disfrutar la vida fuera del trabajo” es un factor que incidió en los estudiantes de medicina al combinar todas las especialidades o al analizarlas en función de la atención primaria. La mayoría de los factores que incidieron en la decisión de carrera en la población participante representaron barreras para la elección de atención primaria (Figura 2) y fueron similares a aquellos identificados en la literatura (14, 19, 30-32,34) y en estudios previos realizados en Honduras (26,27).

El estudio presenta algunas limitaciones. Incluyó a estudiantes de último año de medicina o en servicio social, por lo que los resultados no son generalizables a todos los estudiantes. Podría haber alguna diferencia de percepción sobre la elección de carrera entre estudiantes de último año y los de servicio social, pero dado que el tiempo que separa ambos periodos es escaso la diferencia sería mínima. El cuestionario midió la elección “preferida” de los alumnos de la carrera de medicina, y no la elección “real”.

En conclusión, existe una combinación de factores que inciden en la elección de carrera. Aunque algunos fueron considerados facilitadores en la elección de atención primaria, la mayoría fueron barreras, lo que explica el bajo interés de los participantes. Los resultados del estudio pueden servir para incidir en la definición de políticas públicas y estrategias que apoyen la atención primaria, que desde la academia se enfoquen en la admisión, formación y mentoría de estudiantes de medicina, y desde el sector gubernamental en el otorgamiento de becas de especialidad en carreras de atención primaria, la planificación de re-



cursos humanos para la salud y la contratación de personal de atención primaria en las entidades proveedoras de salud en América Central.

**Contribuciones de los autores.** EBP concibió y planificó el estudio original; RAO, BEM, JAJ, IGMQ, LT, HML y AF planificaron y recolectaron los datos de país. EBP, RAO, BEM y JJV analizaron los datos e interpretaron los resultados. EBP y JJV escribieron el manuscrito. Todos los autores revisaron el manuscrito y aprobaron la versión final.

**Agradecimientos.** A los equipos nacionales que trabajaron en la preparación y realización de la encuesta, la digitalización de los datos y la consolidación de la base de datos en los cinco países; a la Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS por su apoyo técnico y logístico; y a los participantes provenientes de las facultades de medicina de América Central.

**Conflicto de intereses.** Ninguno declarado.

**Declaración.** Las opiniones expresadas en este manuscrito son únicamente responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la RPSP/PAJPH o la Organización Panamericana de la Salud.

## Referencias

1. Starfield B, Shi L, Macinko J. Contribution of primary care to health systems and health. *Milbank Q.* 2005;83(3):457-502. doi: 10.1111/j.1468-0009.2005.00409. x.
2. Villalbi JR, Guarga A, Pasarin MI, et al. An evaluation of the impact of primary care reform on health. *Aten Primaria.* 1999;24(8): 468-74.
3. Friedberg MW, Hussey PS, Schneider EC. Primary care: A critical review of the evidence on quality and costs of health care. *Health Aff (Millwood).* 2010;29(5):766-772. doi: 10.1377/hlthaff.2010.0025

4. Gulliford MC. Availability of primary care doctors and population health in England: Is there an association? *J Public Health Med.* 2002;24(4):252-54.
5. Reyes H, Perez-Cuevas R, Salmeron J, Tome P, Guiscafne H, Gutierrez G. Infant mortality due to acute respiratory infections: The influence of primary care processes. *Health Policy Plan.* 1997;12(3):214-23.
6. Bodenheimer T, Pham HH. Primary care: Current problems and proposed solutions. *Health Aff (Millwood).* 2010;29(5):799-805. doi: 10.1377/hlthaff.2010.0026
7. Lehmann U, Dieleman M, Martineau T. Staffing remote rural areas in middle- and low-income countries: A literature review of attraction and retention. *BMC Health Serv Res.* 2008;8:19-6963-8-19. doi: 10.1186/1472-6963-8-19
8. Burch VC, McKinley D, van Wyk J, et al. Career intentions of medical students trained in six Sub-saharan African countries. *Educ Health (Abingdon).* 2011;24(3):614.
9. Greysen SR, Dovlo D, Olapade-Olaopa EO, Jacobs M, Sewankambo N, Mullan F. Medical education in Sub-saharan Africa: A literature review. *Med Educ.* 2011;45(10):973-986. doi: 10.1111/j.1365-2923.2011.04039.x
10. Bodenheimer T. Primary care: will it survive? *N Engl J Med.* 2006;355(9):861-4.
11. Grayson MS, Newton DA, Thompson LF. Payback time: The associations of debt and income with medical student career choice. *Med Educ.* 2012;46(10):983-991. doi: 10.1111/j.1365-2923.2012.04340.x
12. Phillips JP, Wilbanks DM, Rodriguez-Salinas DF, Doberneck DM. Specialty income and career decision making: a qualita-

- tive study of medical student perceptions. *Medical Education*. 2019;53 (6):593-604
13. Newton DA, Grayson MS, Thompson LF. Money, lifestyle, or values? why medical students choose subspecialty versus general pediatric careers. *Clin Pediatr (Phila)*. 2010;49(2):116-22. doi: 10.1177/ 0009922809350216
  14. Teitelbaum HS, Ehrlich N, Travis L. Factors affecting specialty choice among osteopathic medical students. *Acad Med*. 2009;84(6):718-23. doi: 10.1097/ACM.0b013e3181a43c60
  15. Morra DJ, Regehr G, Ginsburg S. Medical students, money, and career selection: Students' perception of financial factors and remuneration in family medicine. *Fam Med*. 2009;41(2):105-10
  16. Bazargan M, Lindstrom RW, Dakak A, Ani C, Wolf KE, Edelstein RA. Impact of desire to work in underserved communities on selection of specialty among fourth-year medical students. *J Natl Med Assoc*. 2006;98(9):1460-65.
  17. Rosenblatt RA, Andrilla CH. The impact of U.S. medical students' debt on their choice of primary care careers: An analysis of data from the 2002 medical school graduation questionnaire. *Acad Med*. 2005;80(9):815-9.
  18. Tolhurst H, Stewart M. Becoming a GP: a qualitative study of the career interests of medical students. *Aust Fam Physician*. 2005;34(3):204-6.
  19. Senf JH, Campos-Outcalt D, Kutob R. Factors related to the choice of family medicine: A reassessment and literature review. *J Am Board Fam Pract*. 2003;16(6):502-
  20. Compton MT, Frank E, Elon L, Carrera J. Changes in U.S. medical students' specialty interests over the course of medical

- school. *J Gen Intern Med.* 2008;23(7):1095-100. doi: 10.1007/s11606-008-0579-z
21. Scott I, Wright B, Brenneis F, Brett-Maclean P, McCaffrey L. Why would I choose a career in family medicine? Reflections of medical students at 3 universities. *Can Fam Physician.* 2007;53 (11):1956-7.
  22. Erikson CE, Danish S, Jones KC, Sandberg SF, Carle AC. The role of medical school culture in primary care career choice. *Acad Med.* 2013;88(12):1919-26. doi: 10.1097/ACM.0000000000000038
  23. Vanasse A. Attractiveness of family medicine for medical students influence of research and debt. *Can Family Physician.* 2011;57(6):e216.
  24. Breinbauer KH, Fromm RG, Fleck LD, Araya CL. Trends among medical students towards general practice or specialization. *Rev Med Chil.* 2009;137(7):865-72. doi: /S0034-98872009000700001
  25. Santacruz Varela J, Fajardo Dolci G, Hernández Torres F, Real Tovar FA. Metodología para estimar el número de médicos especialistas en México. En: Fajardo Dolci G, Santacruz Varela J, Lavalle Montalvo C, eds. *La formación de médicos especialistas en México.* Ciudad de México: Intersistemas, S. A. de C. V.; 2015. p. 71–151.
  26. Puertas E, Rivera T. Factors that influence career choice in primary care among medical students starting social service in Honduras. *Rev Panam Salud Publica.* 2016;40(5):309-17.
  27. Puertas E, Rodríguez Y, Alvarado E, et al. Career choice in primary care: Pre- and post-comparison of Honduran physicians completing social service. *Rev Panam Salud Publica.* 2017;41: e146
  28. Royston PJ, Mathieson K, Leafman J, Ojan-Sheehan O. Medical student characteristics predictive of intent for rural practice. *Rural Remote Health.* 2012; 12:2107.

29. Rabinowitz HK, Diamond JJ, Markham FW, Santana AJ. The relationship between entering medical students' backgrounds and career plans and their rural practice outcomes three decades later. *Acad Med*. 2012;87(4):493-7. doi: 10.1097/ACM.0b013e3182488c06
30. Scott I, Gowans M, Wright B, Brenneis F, Banner S, Boone J. Determinants of choosing a career in family medicine. *Can Med Assoc J*. 2011;183(1):E1-8.
31. Gill H, McLeod S, Duerksen K, Szafran O. Factors influencing medical students' choice of family medicine: Effects of rural versus urban background. *Can Fam Physician*. 2012;58(11): e649-57.
32. Kiolbassa K, Miksch A, Hermann K, et al. Becoming a general practitioner: Which factors have most impact on career choice of medical students? *BMC Fam Pract*. 2011; 12:25-2296-12-25. doi: 10.1186/1471-2296-12-25
33. Feldman K, Woloschuk W, Gowans M, et al. The difference between medical students interested in rural family medicine versus urban family or specialty medicine. *Can J Rural Med*. 2008;13(2):73-9.
34. Wright B, Scott I, Woloschuk W, Brenneis F, Bradley J. Career choice of new medical students at three Canadian universities: Family medicine versus specialty medicine. *CMAJ*. 2004;170(13):1920-24.
35. Gibis B, Heinz A, Jacob R, Muller CH. The career expectations of medical students: Findings of a nationwide survey in Germany. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109(18):327-32. doi: 10.3238/arztebl.2012.0327
36. Lefevre JH. Career choices of medical students: A national survey of 1780 students. *Med Educ*. 2010;44(6):603-12.
37. Jeffe DB, Whelan AJ, Andriole DA. Primary care specialty choices of United States medical graduates, 1997-2006. *Acad Med*. 2010;85(6):947-58. doi: 10.1097/ACM.0b013e3181dbe77d

38. Puddester DG. Staying human in the medical family: The unique role of doctor-parents. *Med J Aust.* 2004;181(7):395-8.
39. Sarma S, Thind A, Chu MK. Do new cohorts of family physicians work less compared to their older predecessors? The evidence from Canada. *Social Science & Medicine* (1982). 2011;72(12):2049-58. doi: 10.1016/j.socscimed.2011.03.047
40. Bennett KL, Phillips JP. Finding, recruiting, and sustaining the future primary care physician workforce: A new theoretical model of specialty choice process. *Acad Med.* 2010;85(10 Suppl): S81-8. doi: 10.1097/ACM.0b013e3181ed4bae

# Desarrollo de competencias investigativas en el pregrado. Aproximaciones teóricas

## Development of Investigative Competences in the undergraduate. Theoretical approaches

Jesica Yasmin López<sup>1</sup> Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5271-035X>

**Correo electrónico:** [jesica.lopez@ues.edu.sv](mailto:jesica.lopez@ues.edu.sv)

Máryuri García González<sup>2</sup> Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2734-6541>

**Correo electrónico:** [maryuri@cepes.uh.cu](mailto:maryuri@cepes.uh.cu), [maryurigarciagonzalez@gmail.com](mailto:maryurigarciagonzalez@gmail.com)

<sup>1</sup>Universidad de El Salvador; <sup>2</sup>Investigadora del Centro de Estudios para el Perfeccionamiento de la Educación Superior

Año 2022. Vol. 10, No.1 enero-abril, pp.34-48, ISSN: 2308-3042

**Recibido:** 11 de noviembre de 2021 **Aceptado:** 17 de enero de 2022

<http://scielo.sld.cu/pdf/rp/v10n2/2308-3042-rp-10-02-34.pdf>

### Resumen

La educación por competencias es una tendencia que se extiende a la mayoría de las instituciones de educación superior como producto del fenómeno de la globalización, sin embargo, existen vacíos que dificultan que la formación desde este enfoque educativo se desarrolle adecuadamente. El presente artículo de reflexión teórica aborda una serie de precisiones generales acerca de las competencias y más específicamente de las competencias investigativas. Se consultaron diferentes documentos, investigaciones, artículos e informes, lo que permitió un análisis histórico lógico del problema y de contenido. Dentro de los principales resultados se identifica la necesidad imperante de la formación de competencias investigativas en las instituciones de educación superior y el impacto positivo en su desarrollo desde el pregrado como una formación inicial para la investigación. Se concluye que, los cambios en la práctica pedagógica de los docentes, son aspectos imprescindibles para la promoción y el desarrollo de estas competencias, por lo que debe implicar a estudiantes y profesores de manera activa.

**Palabras clave:** Competencias investigativas, formación, practica pedagógica

## Abstract

Competency-Based Education is a trend that has extended to higher educational institutions as a product of the globalization phenomenon; however, there are gaps that hinder the appropriate development of training based on this educational approach. This article of theoretical reflection addresses a series of general clarifications about competences particularly, the investigative skills. Different documents, research, articles, and reports were consulted, which allowed a logical and historical analysis of the problem. Among the main results, the prevailing need for the formation of investigative skills at higher education institutions and the positive impact of their development on undergraduate studies as an initial training stage for researching are identified. It is concluded that changes in the pedagogical practice of teachers are the key elements for the promotion and development of these skills, which must actively involve students and teachers.

**Keywords:** Research skills, training, pedagogical practice.

## Introducción

A lo largo del tiempo los objetivos y procedimientos de las universidades se han modificado para dar respuesta a los cambios sociales, o en algunos casos han actuado promoviendo los mismos, por lo que las características tan cambiantes de la sociedad actual constituyen un verdadero desafío para las instituciones de educación superior, debido principalmente a la globalización y a los avances en la ciencia y la tecnología.

Ya desde el siglo pasado la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (Unesco) se refería a propósito de la educación “La Educación encierra un Tesoro”, es el desarrollo integral del ser humano, para lograrlo menciona que la educación tiene cuatro pilares, los cuales favorecen este desarrollo: aprender a conocer, aprender a hacer, aprender a ser y aprender a vivir juntos [1]. Esta concepción amplía el ámbito de intervención de la educación vol-



viéndola más integral y promoviendo reformas en los modos y métodos de enseñanza, este cambio metodológico se asocia a la promoción de actividades académicas que faciliten el adquirir nuevas habilidades, capacidades y aptitudes englobadas en las competencias; según la misma entidad, se trata de un enfoque que tiene en cuenta los aprendizajes que el estudiante debe tener para que su rol, ante la construcción de su proyecto de vida tanto en lo personal, social, como profesional sea activo, responsable y creativo [2].

A partir de estos hechos, el enfoque por competencias se convierte en un modelo a seguir por las instituciones de educación superior a nivel mundial transformando los métodos y formas en que estas realizan el proceso enseñanza-aprendizaje, a fin de desarrollar en los estudiantes el pensamiento crítico, el trabajo en equipo, la vinculación de la teoría con la práctica, las habilidades comunicativas, el sentido de responsabilidad, solidaridad, la ética y el compromiso social, la toma de decisiones, actitud positiva y propositiva hacia el cambio y la innovación para la resolución de problemas de una forma integral, apuntando hacia cuestiones relativas al bienestar de la población, así como al establecimiento de una base local relevante y sólida en ciencia y tecnología[3].

Por otra parte, es de amplio reconocimiento la importancia de la investigación para el desarrollo de los países, la actualización de las ciencias, disciplinas y profesiones; por lo que hace parte de la dinámica natural de las instituciones de educación superior, generando en estas un compromiso por ejercer la actividad investigativa y formar en los estudiantes las competencias investigativas. En ese sentido, estas competencias adquieren una mayor relevancia para las instituciones de educación superior, de manera que para poder integrarlas y desarrollarlas adecuadamente es necesario estudiarlas a profundidad, el presente trabajo tiene por objetivo reflexionar sobre las mismas, su concepción, la necesidad de desarrollar estas competencias en la educación superior y el proceso de formación inicial para la investigación en el pregrado, esto como parte de un proyecto de tesis doctoral.

## Desarrollo

### **Precisiones generales de las competencias y de las competencias investigativas**

El término competencias, en su evolución, ha tenido una multiplicidad de perspectivas, en torno al ámbito laboral-profesional ya desde 1993 Spencer y Spencer definían que una competencia es “una característica subyacente en una persona que está causalmente relacionada con el desempeño, referido a un criterio superior o efectivo, en un trabajo o situación” [4].

En 1994 la UNESCO posiciona a la educación como la base del desarrollo integral del ser humano, a través de cuatro pilares: aprender a conocer (nivel conceptual), aprender a hacer (nivel fáctico), aprender a ser (nivel ontológico) y aprender a vivir juntos (nivel humanístico), el cual sienta las bases del enfoque por competencias en el ámbito educativo, ampliando el ámbito de intervención de la educación volviéndola más integral y promoviendo reformas en los modos y métodos de enseñanza, este cambio metodológico se asocia a la promoción de actividades académicas que faciliten el adquirir nuevas habilidades, capacidades y aptitudes [1].

Posteriormente, en 1998, la misma entidad aporta un carácter integral del enfoque por competencias en la educación “se trata de un enfoque que tiene en cuenta los aprendizajes que el estudiante debe tener para que su rol, ante la construcción de su proyecto de vida tanto en lo personal, social, como profesional; sea activo, responsable y creativo” [2]; esto la relaciona entonces la educación al proyecto de vida, incidiendo en todos los ámbitos de desempeño de las personas, influyendo por tanto en su desarrollo, bienestar y calidad de vida tanto personal como social.

Por otra parte, debido a su complejidad y multideterminación, las competencias pueden explicarse desde diferentes posturas teóricas, entre estas, las más fundamentales en el ámbito educativo son las concepciones conductista, ya que plantea que la adquisición y

desarrollo de las competencias se pueden medir que se puede observar su evolución a lo largo del proceso formativo; funcionalista, ya que plantea que el proceso de enseñanza y aprendizaje parte de un estándar o parámetro que debe alcanzar el estudiante, los cuales se desprenden principalmente del ámbito laboral; constructivista, centrando el proceso educativo en el aprendizaje y en el estudiante, a través de la búsqueda y construcción de conocimientos significativos; utilizando estrategias como el análisis y la solución de dificultades y problemas.

Se suman a estas recientemente la perspectiva interdisciplinar y el enfoque socioformativo, la primera en función de la solución de problemas complejos que contempla las situaciones reales en una perspectiva multidisciplinar; la segunda perspectiva por su se enfoca en los estudiantes desde la gestión del talento humano en la formación de las competencias esperadas, acorde con los requerimientos de la vida cotidiana, de la sociedad, de las disciplinas, de la investigación y del mundo productivo, todo esto enmarcado en el proyecto educativo institucional.

Desde esta última perspectiva, Tobón define las competencias como “procesos complejos que las personas ponen en acción-actuación-creación, para resolver problemas y realizar actividades, aportando a la construcción y transformación de la realidad, para lo cual integran el saber ser, el saber conocer y el saber hacer, teniendo en cuenta los requerimientos específicos del entorno, las necesidades personales y los procesos de incertidumbre, con autonomía intelectual, conciencia crítica, creatividad y espíritu de reto, asumiendo las consecuencias de sus actos y buscando el bienestar humano” [5].

Estos elementos refieren a la formación de personas aptas o adecuadas, eficientes y cualificadas, superando así la visión tradicionalista, dado que se precisa la aplicación de los conocimientos adquiridos en un contexto determinado, dando sentido y significado a lo aprendido, y no sólo a la memorización de conocimientos, que queda en el plano declarativo, y que no son suficientes para la comprensión, transferencia y aplicación de los conocimientos adquiridos; más re-

cientemente el mismo autor define las competencias como “actitudes integrales ante actividades y problemas del contexto, con idoneidad y compromiso ético, integrando el saber ser, el saber hacer y el saber conocer en una perspectiva de mejora continua” [6].

En síntesis, a noción de competencia ha enriquecido su significado en el campo educativo, coincidiendo en esto con Perrenoud, para quien las competencias se resumen en un saber hacer en situaciones concretas que requieren la aplicación creativa, flexible y responsable de conocimientos habilidades y actitudes [7], lo cual le brinda un carácter más concreto e integrado de las mismas.

Otra propuesta interesante en esa línea de ideas es la propuesta de González et al., quienes identifican la competencia como “la integración del grado de preparación, capacitación y desarrollo del individuo como resultado de su aprendizaje, donde se basa la formación en los principios básicos, saber, saber hacer, saber ser, saber compartir o vivir en colectivo académico, laboral y social poniendo en juego conocimientos, habilidades, valores, actitudes, destrezas y experiencias en contextos diferentes” [8]. Lo cual refieren a un enfoque holístico que integra diferentes aspectos, ámbitos y contextos de las personas bajo el marco del aprendizaje y la formación, lo cual denota una revolución de la pedagógica y didáctica tradicionalista porque el énfasis ya no se pone en la docencia si no en el aprendizaje.

Por otra parte, en el ámbito de la formación universitaria el Proyecto Tuning: Reflexiones y perspectivas de la educación superior en América Latina [9] definió, como una de sus primeras tareas, las competencias genéricas y específicas para la educación superior, las primeras son comunes a una rama profesional, relevantes en todas las disciplinas académicas y actividades extracurriculares o de apoyo aplicables a contextos académicos, personales, sociales y laborales; y las segundas son las propias de cada profesión, estas describen los conocimientos, habilidades y actitudes asociados a los diferentes saberes de índole técnico, vinculados a una ocupación o actividad productiva, por lo tanto, éstas implican un nivel de dominio.

El mencionado proyecto puso especial énfasis en la determinación de las competencias genéricas, en donde la capacidad para formular y gestionar proyectos de investigación es una de las competencias incluidas, si bien estas generalmente son comprendidas como el conjunto de conocimientos, actitudes, habilidades y destrezas necesarias para llevar a cabo la elaboración de un trabajo de investigación, existen varios planteamientos al respecto de ellas que resulta importante precisar.

En primer lugar, según Bunge para poder expresar diferentes conocimientos de una respectiva investigación se tiene que hacer un proceso de diferenciación sobre dos factores primordiales que serían el conocimiento vulgar y el conocimiento científico, [11]. En complemento a esto se considera que las competencias investigativas deben incluir los fundamentos filosóficos, epistemológicos, metodológicos y técnicos instrumentales, que permitan la construcción de conocimientos científicos en un área determinada, así como la expresión de trabajos científicos en forma oral y escrita; además de la participación en la aplicación de conocimientos a través de la práctica transformadora [10].

Por su parte Balzaldúa, profundiza más en algunos aspectos y plantea que estas competencias incluyen la comprensión y aplicación pertinente de los postulados básicos de los métodos de investigación, así como de la instrumentación requerida para recopilar, organizar, analizar e interpretar información cuantitativa y cualitativa [12].

A propósito de ello, Estrada declara que las principales concepciones acerca de competencia investigativa deben incluir las siguientes nociones:

- La competencia es una integración de varios componentes como el cognitivo, el metacognitivo, la motivación y las cualidades personales que permiten el desempeño deficiente en la actividad investigativa.
- Se debe tener en cuenta la relación académico-investigativo y laboral-investigativa.

- Se encuentra relacionada con las etapas de la investigación científica o tecnológica, identificándose habilidades específicas por cada etapa.
- Se debe considerar el trabajo en equipo, las relaciones interpersonales y la interdisciplinariedad [13].

A partir de los planteamientos anteriores se puede asumir la competencia investigativa como el conjunto de conocimientos, actitudes, habilidades y destrezas necesarias para llevar a cabo la elaboración de trabajos de investigación como respuesta a problemas del contexto, con idoneidad y compromiso ético, integrando el saber ser, el saber hacer y el saber conocer en una perspectiva de mejora continua. Además, denota el carácter de transversalidad en la formación de estos, desde la comprensión, interpretación y argumentación hasta llegar a una etapa en que las competencias adquiridas le permitan hacer propuestas coherentes para solucionar problemáticas desde la ciencia.

### **Las competencias investigativas y su necesidad formativa**

La investigación posibilita el desarrollo de los países, contribuyendo a la actualización de las ciencias, disciplinas y profesiones; hace parte de la dinámica natural de las instituciones de educación superior, generando en estas un compromiso por ejercer la actividad investigativa formal, desde donde se buscaría propiciar en los estudiantes el pensamiento crítico, científico y creativo; de manera que puedan contrastar y verificar los conocimientos y aplicarlos en la práctica. Para González et al., las competencias investigativas propician la formación y desarrollo de actitudes y valores personales unidos a las aptitudes y capacidades técnicas, conjugando los intereses individuales, permitiéndoles proyectarse adecuadamente al entorno social [14].

De manera que es necesario formar estas competencias en los estudiantes para que puedan hacer propuestas de solución a los problemas de la sociedad desde la ciencia, contribuyendo además a la generación de conocimiento.

Sin embargo, de acuerdo con datos de la Unesco y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (Cepal), el desarrollo de la investigación científica en Latinoamérica, en general, es pobre y los resultados de ella no son suficientes para lograr un desarrollo significativo [15]. Estos elementos son un reflejo del desafío que enfrenta la región por fomentar la investigación, siendo las instituciones de educación superior uno de los principales llamados a generar los cambios necesarios.

A pesar de que en las universidades se investiga un poco más que en las instituciones de educación media y básica, la actividad investigativa en la región latinoamericana aun no alcanza niveles significativos ni en producción ni en publicaciones, si bien ha mostrado cierto grado de avance, continua viéndose limitada en la mayoría de casos a la elaboración de un trabajo de grado, cuya calidad resulta cuestionable en cuanto al aporte interpretativo, coherencia, el soporte de la argumentación y la profundidad de sus propuestas; estas deficiencias se ven reflejadas tanto en su rendimiento académico, como a futuro en su desempeño profesional [16].

En el mundo globalizado, complejo exige indagar y aplicar respuestas innovadoras hacia el desarrollo humano integral y la mejora de la calidad de vida de los seres humanos. En ese sentido la universidad, en su función social, establece políticas y estrategias encaminadas a los fines que expresa en su misión y visión institucional, por tanto, debe impulsar una formación que vincule la ciencia y la tecnología en la construcción del conocimiento científico, para lo cual se hace necesario comprender el sentido que se le confieren a la investigación en la comunidad universitaria, dado que este es el escenario donde se concreta la formación de competencias investigativas a través de los currículos y planes de estudio, los cuales deben propiciar los espacios adecuados para el desarrollo de la investigación.

## **Impronta en la educación superior de las competencias investigativas**

Siendo que la evolución y el desarrollo de las competencias es subyacente a aquellas que estén establecidas en el perfil de una carrera o de una materia, requiere que el estudiante enfrente situaciones, tanto de estudio como de trabajo, similares a las que deberá afrontar durante su vida profesional; por lo tanto, se debe potenciar el desarrollo de la competencia investigativa desde la actividad laboral relacionada con el perfil profesional que se está formando y deben fomentarse en el transcurso de los años en la Universidad.

La formación basada en competencias investigativas en los estudiantes de pregrado constituye una propuesta que parte del aprendizaje significativo y se orienta a la formación humana integral que conforma la teoría con la práctica en las distintas actividades [17],

estos indican que la investigación debe entonces establecerse de una manera vivenciada en la cotidianidad de la vida universitaria como una cultura investigativa, denotando una construcción colectiva que demanda de acciones simultáneas y congruentes en los terrenos subjetivos, intersubjetivos y objetivos, dentro de una planificación cuidadosa y progresiva de las formas en que los actores la desarrollan; todo esto sobre la base de una pedagogía que ayude a la formación de una actitud científica en los estudiantes, que lo guíen en el aprender a interrogar, aprender a aprender, a buscar la información y a querer cuestionar su propia experiencia de aprendizaje en un proceso continuo y dinámico.

Es ampliamente reconocida la noción de que “aprender a investigar, investigando, es la forma más efectiva de aprender a investigar”, esto nos refiere a un tipo de aprendizaje por descubrimiento, el cual de acuerdo con Brunner resulta efectivo dado que se obtiene cuando el ser humano se enfrenta a una situación o problema no solo para solucionarlo sino para transferir el conocimiento adquirido; de adquirir los conocimientos, habilidades, valores y actitudes que precisa el quehacer investigativo deben adquirirse a través de la relación de



la teoría-práctica [18]. Estos planteamientos concuerdan con los de Rojas Soriano, quien plantea que para desarrollar estas competencias debe permitirse que el estudiante “participen en la aplicación de conocimientos a través de la práctica transformadora” [10].

Estrada menciona otros aspectos que deben considerarse en la formación y desarrollo de competencia investigativa [13]:

- Las características personales del individuo y la formación de su personalidad en sus principales componentes cognitivos, motivacionales, experiencia social propia, metacognitivos y cualidades personales.
- Las habilidades profesionales generales y particulares que debe asimilar y dominar el sujeto acorde con su profesión.
- Las habilidades con el uso de la tecnología tanto para la realización de la actividad investigativa en todas sus etapas, como en el uso efectivo de esta de manera que le permita comunicarse e interactuar con otros investigadores en la realización de investigaciones a distancia en grupos multidisciplinarios.
- La formación científica e investigativa interdisciplinaria y transdisciplinaria.
- La relación cognitiva-afectiva del proceso de enseñanza-aprendizaje.
- La formación multilateral y armónica del individuo.

Estos elementos denotan que la docencia en la enseñanza superior requiere de personal docente con profundos conocimientos y un saber especializado; exige además un sentido de responsabilidad personal e institucional en la tarea de brindar educación y bienestar a los estudiantes y a la comunidad en general, así como para alcanzar altos niveles profesionales en las actividades de estudio y la investigación; de acuerdo con la UNESCO esto puede mantenerse si hay un esfuerzo riguroso de parte de las instituciones de educación superior[3].

Desde los colectivos académicos y profesionales entonces, se debe orientar la forma de pensar y actuar planteando espacios de

diálogo entre un conjunto de valores éticos y epistémicos y un modelo de acción, generando espacios de discusión e intercambio, dando mayor apertura a la participación, donde las competencias se insertan y cada vez ganan más espacio [19].

Estos elementos ponen especial énfasis en el rol del docente, quien para formar competencias deben enfocarse en los estudiantes con sus competencias de entrada y competencias de egreso, así como en la gestión del talento humano necesario para llevar a cabo la formación de las competencias esperadas, acorde con los requerimientos de la vida cotidiana, de la sociedad, de las disciplinas, de la investigación y del mundo productivo, todo esto enmarcado en el Proyecto Educativo Institucional [20], desde el macro currículo hasta el micro currículo, en el cual el docente incide de forma directa en el proceso enseñanza-aprendizaje y puede contribuir con la formación integral para potenciar dicha competencia el personal docente debe contar con los saberes, actitudes, valores y requerimientos necesarios para el diseño de la estrategia dentro del micro currículo [21].

En ese sentido, en el proceso enseñanza-aprendizaje si se entiende y se aborda la didáctica universitaria como un proyecto, se traduce los métodos de las ciencias y su metodología de investigación en competencias científicas e investigativas, a este proceso se le denomina investigación formativa; a propósito de esto para Jiménez la investigación formativa consiste en llevar a la educación superior, mediante la didáctica concebida como proyecto, al proceder de los métodos científicos y su operatividad a través de las metodologías de la investigación científica, dado que es del proceder metódico de donde emanan las competencias científicas [22]

La investigación formativa se puede además integrar con otras estrategias didácticas obteniendo resultados favorables, de acuerdo con algunos estudios, por ejemplos el proyecto de aula, la enseñanza abierta, los semilleros de investigación, aprendizaje basado en problemas, tecnologías de la información y comunicación, entre otros; permitiendo que el proceso de enseñanza-aprendizaje se concreti-

ce integralmente y de los cuales ya existe algunos estudios que han comprobado cierto grado de efectividad [23-27].

Bajo estos preceptos de entiende a la investigación como un proceso integrado al currículo y eje transversal en la formación en donde no exista separación entre el aprendizaje científico-técnico en el desarrollo integral del estudiante, constituyéndose por tanto en una herramienta para la consolidación de la cultura investigativa, la cual a su vez fomenta el desarrollo y progreso tanto en el plano personal como social. De acuerdo con Hernández, la investigación formativa es un proceso de búsqueda de nuevo conocimiento que debe estructurarse desde los primeros años de la carrera, además constituye un reto en la actualidad para las universidades reformular el papel del profesor como investigador desde la materia que imparte y a la vez formar y desarrollar en los estudiantes competencias investigativas que los preparen para generar conocimientos y resolver problemas presentes en su práctica profesional [28].

De ahí que el desarrollo de competencias investigativas debe fomentarse desde el pregrado, propiciando la formación y desarrollo de actitudes, valores, aptitudes y capacidades en los individuos que les permita proyectándose adecuadamente al entorno social. La mejora en la formación y desarrollo de las competencias investigativas desde el pregrado permitirá alcanzar los logros básicos inherentes a la capacidad investigadora que podrán ser potenciados posteriormente hacia competencias más complejas.

## **Conclusiones**

El enfoque de competencias es relativamente nuevo en el entorno educativo, constituyéndose como un fenómeno de innovación con amplias perspectivas de desarrollo, para lo cual se hace necesario asumir esta nueva categoría, a fin de comprenderla e integrar en aras de lograr cada vez mejores profesionales. Por ello la tarea inmediata es la simplificación de las metodologías de implementación, la clarificación de nomenclaturas, supuestos y procedimientos para la

interpretación y aplicación correcta del enfoque, a fin de generar las condiciones ideales que permitan su desarrollo de la mejor manera posible, para lo cual resulta conveniente prepararse, experimentar e identificar competencias, y en algunos casos, llevándolas a la práctica experimentando cambios en los procesos de enseñanza-aprendizaje a fin de adaptarlos al logro de competencias.

Es necesario continuar realizando estudios sobre la formación de competencias investigativas en los procesos enseñanza-aprendizaje en los contextos específicos de las instituciones de educación superior, en donde se involucren investigadores, profesores y estudiantes generando una dinámica compleja y en donde se asuma el proceso educativo desde un enfoque de sistemas, mismo que involucre desde el aula hasta la institución educativa, así como a los sistemas externos relacionados.

De ahí que todo proyecto orientado al desarrollo de las competencias investigativas debe enfocarse en los procesos necesario para llevar a cabo la formación de las competencias esperadas, acorde con los requerimientos de la vida cotidiana, de la sociedad, de las disciplinas y del mundo productivo; esto conlleva a un cambio en las prácticas pedagógicas como elemento clave, mismo que implica la participación activa, crítica y reflexiva de estudiantes y profesores; todo esto enmarcado en el proyecto educativo institucional.

### **Conflicto de intereses**

Las autoras declaran que no existen conflictos de intereses con otros investigadores u otras organizaciones académicas o científicas, todos están de total acuerdo con lo escrito en este informe y aprueban la versión final.

### **Contribución de autoría**

Las 2 autoras participaron en las etapas de diseño de la investigación, recolección de datos, procesamiento, análisis y elaboración del texto, del mismo modo revisaron y aprobaron el contenido final.

## **Autores**

Jesica Yasmin López Villalta. MsC. Profesora Universidad de El Salvador. Aspirante a doctor en el Programa de Doctorado en Educación Superior, Facultad Multidisciplinaria de Occidente, Universidad de El Salvador.

Máryuri García González. Doctora en Ciencias. Profesora Titular – Investigadora del Centro de Estudios para el Perfeccionamiento de la Educación Superior. CEPES. Universidad de la Habana. Cuba.

## **Referencias bibliográficas**

1. Delors J. Los cuatro pilares de la educación, en La Educación encierra un tesoro. UNESCO; 1994.
2. Unesco. Informe mundial sobre la educación 1998: los docentes y la enseñanza en un mundo en mutación. UNESCO; 1998. 174 p.
3. UNESCO. Conferencia Mundial sobre la Educación Superior 2009: La nueva dinámica de la educación superior y la investigación para el cambio social y el desarrollo. [Internet]. UNESCO Biblioteca Digital; 2009 Disponible en: [https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000183277\\_spa](https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000183277_spa)
4. Spencer L, Spencer S. Competence at Work: Models for Superior Performance. New York: John Wiley and Sons [Internet]. 1993; Disponible en: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposz-je\)\)/reference/ReferencesPaper.s.aspx?ReferenceID=1936029](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposz-je))/reference/ReferencesPaper.s.aspx?ReferenceID=1936029)
5. Tobón S. Formación basada en competencias: pensamiento complejo, diseño curricular y didáctica [Internet]. 2006. Disponible en: [https://books.google.com.sv/books/about/Formaci%C3%B3n\\_basada\\_en\\_competencias.html?hl=&id=71-XswEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.sv/books/about/Formaci%C3%B3n_basada_en_competencias.html?hl=&id=71-XswEACAAJ&redir_esc=y)
6. Tobón S. La formación basada en competencias en la educación superior: el enfoque complejo. Universidad Autónoma de Guadalajara, México. 2008

7. Perrenoud P. Construir las competencias, ¿es darle la espalda a los saberes? REDU Rev Docencia Univ. 2008;6(2):1-16.
8. González MG, Cárdenas TO, Pérez MG. La formación de competencias y la dirección en educación superior, una necesidad ineludible. Revista Caribeña Ciencias Sociales [Internet]. 2013, 10(6). Disponible en: [https://ideas.repec.org/a/erv/rccsrc/y2013i2013\\_1006.html](https://ideas.repec.org/a/erv/rccsrc/y2013i2013_1006.html)
9. Proyecto Tuning: Reflexiones y perspectivas de la educación superior en América Latina [Internet]. Comisión Europea; 2004 [citado 6 de diciembre de 2021]. Disponible en: <http://www.tuningal.org/>
10. Soriano RR. Formación de investigadores educativos. Plaza y Valdés; 1992. 260 p.
11. Bunge M. La Investigación Científica (3ra ed.). Siglo veintiuno. Barcelona; 2004
12. Balzaldúa A. Identificación de competencias de investigación para nivel de licenciatura. En: Competencias educativas, profesionales y laborales Un enfoque para el seguimiento de egresados en instituciones de nivel superior. Comisión de Investigación de FIMPES; 2007.
13. Estrada O. Sistematización teórica sobre la competencia investigativa. Revista Electrónica Educare. 2014;18(2):177-94.
14. Paz C, Estrada L, Chinchilla B, Valladares N. Desarrollo de competencias investigativas en el pregrado. Aproximaciones teóricas. 2017. Disponible en: <https://posgrado.upnfm.edu.hn/files/VRIP/Reglamentos/Desarrollo%20de%20Competencias%20Investigativas.pdf>
15. González MG, Cárdenas TO y Pérez MG. La formación de competencias y la dirección en educación superior, una necesidad ineludible. Revista Caribeña de Ciencias Sociales, 2013, (10) Disponible en: [https://ideas.repec.org/a/erv/rccsrc/y2013i2013\\_1006.html](https://ideas.repec.org/a/erv/rccsrc/y2013i2013_1006.html)
16. Panorama Social de América Latina 2019 [Internet]. CEPAL; 2019 [citado 4 de diciembre de 2021]. (Comisión Económica para América Latina y el Caribe). Disponible en: <https://www.cepal.org/es/publicaciones/44969-panorama-social-america-latina-2019>

17. Medina M, Barquero J. 20 Competencias profesionales para la práctica docente [Internet]. 2017 [citado 4 de diciembre de 2021]. (Trillas). Disponible en: <https://www.bookdepository.com/es/20-Competencias-profesionales-para-la-pr%C3%A1ctica-docente-Manuel-Medina-Elizondo-Jos%C3%A9-Daniel-Barquero-Cabrero/9786071724489>
18. Moreira L, Cano E, Moreira J. Formación basada en competencias en los estudiantes de pregrado de Latinoamérica. FIPCAEC. 2021;6 (1): pp
19. González MG, Rodríguez AG, Miras YG. Reflexiones sobre las competencias de dirección y posicionamiento ético en la Educación Superior. *Revista Referencia Pedagógica*. 2021;9(1):15-26.
20. Tobón S. Secuencias didácticas: aprendizaje y evaluación de competencias. 2010.
21. Villada D. Competencias. Colombia: Sintagma; 2007.
22. Girón MOY. Desarrollo de la competencia investigativa: una mirada desde el micro currículo. *Revista Guatemalteca de Educación Superior*. 2021; 5(1):160-170. Disponible en: <https://doi.org/10.46954/revistages.v5i1.83>
23. Jiménez GYI, Hernández JJ, González MA. Competencias profesionales en la educación superior: justificación, evaluación y análisis. *Innov Educ México DF*. 2013;13(61):45-65.
24. Hurtado L. La Investigación Formativa para el Estudiante de Derecho. Proyectos de aula como estrategia de investigación formativa socio-jurídica. *Revista Jurídica SSIAS*. 2010.
25. Aranao MO. Investigación formativa y competencia comunicativa en Educación Superior [Internet] Universidad de Málaga; 2015 [citado 5 de enero de 2022]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=73888>
26. Labrador D, González E, Prado D. Estrategia para la formación de competencias investigativas en pregrado. *Revista Ciencias Médicas de Pinar del Rio*. 2020; 24(6).

27. Álvarez D, Arias V. La enseñanza abierta como estrategia para la formación en competencias investigativas en Educación Superior. *Revista Científica Universidad Distrital*. Colombia 2016; (2):123-131
28. Paz C, Estrada L, Chinchilla B. Desarrollo de Competencias Investigativas en el Pregrado. Universidad Pedagógica Nacional Francisco Morazán. Honduras. 2017
29. Hernández M, Panunzio A, Nader J. Las competencias investigativas en educación superior. *Revista Científica Yachana*. 2019; 8(3): 1-13



# **Factores de riesgo y factores de protección asociados al ingreso, permanencia y abandono de jóvenes a la pandilla o mara. Vivencias e interpretaciones de sus actores**

## **Risk Factors and Protective Factors Associated with the Entry, Stay and Desertion of Young People to Gangs: Experiences and Interpretations from Participants**

*Mónica Raquel Ventura*

Maestra en Metodología de la Investigación Científica

Profesora universitaria

Escuela de Posgrados, Universidad Evangélica de El Salvador

Email: [mventur32@gmail.com](mailto:mventur32@gmail.com)

Recibido: 09/10/16

Aceptado: 22/04/17

<https://www.camjol.info/index.php/CCS/article/view/6021>

## Resumen

Para este estudio se investigó a tres grupos de individuos relacionados con pandillas o maras juveniles en El Salvador con el propósito de evidenciar factores de riesgo y factores de protección que motivan o evitan la incorporación a estos grupos proscritos, a saber: pandilleros presidarios o «testigos criteriados»<sup>1</sup>, expandilleros e individuos que habiendo crecido en ambientes de fuerte influencia de pandillas decidieron no incorporarse. La teoría consultada permitió analizar algunos ambientes socializadores: familia, escuela, amistades y domicilio, a fin de conocer, desde la perspectiva de los actores, vivencias e interpretaciones que han forjado sus decisiones. Desde una perspectiva de investigación cualitativa, se priorizó el diseño fenomenológico interpretativo para el análisis. Se encontró que la incorporación a las pandillas y el comportamiento resiliente significan para los individuos decisiones difíciles de constantes esfuerzos. Además, las explicaciones de cada grupo buscan racionalizar «socialmente» sus comportamientos: los pandilleros buscan mantener un estilo de vida a costa de la población y mediado por los delitos, el miedo engendrado y el poder que detentan. Los expandilleros tienen que reincorporarse a la vida prosocial y buscan mecanismos para romper las reticencias y marginaciones de la población, para lo cual la religión les provee la posibilidad de «mimetizarse». Finalmente, los resilientes, que lograron «salir adelante» sin inmiscuirse con las pandillas, se enorgullecen de su condición.

**Palabras clave:** maras o pandillas juveniles, factores de riesgo, factores de permanencia, factores de protección, resiliencia, expandilleros, El Salvador.

---

1 Los testigos «criteriados», llamados también «imputados con beneficios legales», son personas que no fueron procesadas penalmente a cambio de que incriminaran a sus cómplices en los ilícitos que cometieron. Centro de Documentación Judicial. Tomado del Código Procesal Penal, Art. 20. Disponible en: [http://www.jurisprudencia.gob.sv/Visor-MLX/Tesouro/tes\\_tesouro.aspx?nTerminopdr=2&nTermino=2064&nTesouro=1&strTermino=CRITERIO%20DE%20OPORTUNIDAD&nBaseDato=1](http://www.jurisprudencia.gob.sv/Visor-MLX/Tesouro/tes_tesouro.aspx?nTerminopdr=2&nTermino=2064&nTesouro=1&strTermino=CRITERIO%20DE%20OPORTUNIDAD&nBaseDato=1)

## Abstract

Three groups of individuals related to gangs in El Salvador were investigated in order to identify risk factors and protection factors that motivate or avoid the incorporation to these outlawed groups. These three groups are: convicts gang members or witnesses testifying under a plea-bar- gain agreement, former gang members and individuals that have lived in gang influenced neigh- borhoods, but decided not to be members. The consulted theory allowed the analysis of some socializing environments such as family, school, friendships and residency. The aim of this is to know the experiences and interpretations that have forged the decisions of the participants of each group. From a qualitative research approach, it was prioritized the interpretative phenomenological design for the analysis. It was found that the incorporation and resilience to gangs is a tough decision with constant efforts for the individuals. Moreover, each group gives explanations that try to “socially” rationalize their behavior: gang members try to maintain a lifestyle at the expenses of the population by the means of their crimes, generated fear and the power they hold. Ex-gang members have to reincorporate to the prosocial life and look for ways to break the reticence and rejections from the population. For this, religion gives them the possibility of “mingle.” Finally, the resilient ones, who managed to “get ahead” without interfering with the gangs, take pride in their condition.

**Keywords:** Gangs, Young Gangs, Risk Factors, Permanence Factors, Protection Factors, Resi- lience, Ex-Gang Members, El Salvador.

## Introducción

En este estudio se plantea interpretar desde las vivencias de pandilleros, expandilleros y personas resilientes el fenómeno social de las pandillas juveniles a través de sus relatos de vivencias en el mundo de maras<sup>2</sup>.

Se consultó una diversidad de documentos que proponen predictores de la conducta criminal, como modelos biológicos, psicológicos y sociológicos, así como los enfoques de la elección racional y la anomia, planteados en otros estudios, como el de Vásquez (2003); además, se consideró un conjunto de teorías, definiciones y enfoques de las conductas resilientes a fin de construir un fundamento conceptual relacionado con el fenómeno estudiado y del cual surgieron las categorías de análisis elegidas con las cuales se pudo inferir las conclusiones del estudio. La familia, la escuela, las amistades y las condiciones de vida alrededor del domicilio (Vásquez, 2003) fueron, concretamente, las categorías fuente de información acerca de los factores de riesgo y de los factores de protección para la resiliencia, el ingreso a las pandillas y la deserción.

El abordaje metodológico cualitativo permitió acuñar información de los tres grupos mencionados: pandilleros (criminales convictos), individuos resilientes (que basados en su interpretación supieron soportar y sobrellevar algunas dificultades para mantener conductas prosociales), y, finalmente, un grupo focal de expandilleros que pertenecen a una organización religiosa.

## Metodología de la investigación

Se describen a continuación los detalles pertinentes relacionados con los grupos objeto de investigación. Para contextualizar en

---

2 «Mara» y «pandilla», en el argot de estos grupos, tienen una diferencia semántica: «mara» hace referencia a la Mara Salvatrucha 13 (MS13) y pandilla al Barrio 18. En este estudio se utilizan indistintamente.

tiempo y espacio es importante aclarar que los sujetos radican en las principales urbes de El Salvador y que las entrevistas se realizaron desde el segundo semestre de 2013 hasta abril de 2014. También son omitidos, por discreción judicial obvia, los detalles de los expedientes de los individuos.

- **Pandilleros.** Tres individuos de quienes se obtuvo sus narrativas de vivencias, miembros activos destacados de la MS13 y de la pandilla Barrio 18, de quienes se comprobó judicialmente su participación en hechos delictivos y que ahora son «testigos criteriados». La corporación policial eligió a los sujetos y facilitó las circunstancias para poder entrevistarlos. Por el caso excepcional de oportunidad de entrevistar a estas personas con beneficios legales que otorga la Fiscalía General de la República y porque se encuentran bajo régimen de protección especial, se omitieron los nombres de estos personajes y se utilizaron seudónimos, además de asignárseles un número según fueron entrevistados.
- **Resilientes.** Se compilaron las narrativas de vivencias de tres individuos que, habiendo crecido en condiciones de total proclividad para involucrarse en alguna forma de vida delictiva, fueron «resilientes» a hacerlo. Se ubicaron estas personas en instituciones como la Universidad de El Salvador (UES) y el Instituto Nacional de la Juventud (INJUVE).
- **Expandilleros.** Asimismo, se tuvo la oportunidad de organizar un grupo focal por medio de una ONG privada en el que participaron seis expandilleros que actualmente tienen afinidad con una organización religiosa.

Los datos fueron obtenidos de los propios testimonios de las personas y de su conducta observable, de sus rasgos, características y perfiles, según su «versión» desde su condición clandestina/judicial de pandilleros en el contexto de su pasado; asimismo, de expandilleros que hoy se han entregado a la vida religiosa y de los resilientes entrevistados en las situaciones en las que se hallan. Siguiendo una guía de entrevista, cada individuo relató su vida y posteriormente la comparación se realizó por la exploración de las cuatro categorías de

análisis elegidas, de cada una de las narrativas de vivencias de pandilleros, expandilleros y resilientes.

Para esta investigación se utilizó la fenomenología como perspectiva metodológica de análisis, ya que se busca conocer y descifrar los significados del ser humano que vive una experiencia de un fenómeno específico (Corbetta, 2007) por el cual se explica y da sentido al mundo y le permite proceder en su vida cotidiana con comportamientos resilientes o incorporándose en grupos de pandilleros. Con lo anterior se consigue sistematizar el conocimiento intersubjetivo del individuo, estructurar el hecho y luego construir conocimiento científico mediante la realización de una representación social del fenómeno, dando explicaciones y develando los significados ocultos de la conciencia (Rodríguez, 1996).

## **Análisis y discusión de resultados**

### **1 El contexto familiar**

El siguiente análisis interpretativo del contexto familiar está basado en las siguientes fuentes: las narrativas de vivencia de los entrevistados, de los cuales se han sintetizado, además, algunos datos en la Tabla 1, y algunos argumentos encontrados en la literatura revisada para este estudio.

Las investigaciones argumentan que la estructura familiar o los vínculos familiares dañados son un buen predictor de futuras conductas delictivas por parte de los jóvenes (Vásquez, 2003). En el estudio se pudo constatar que la estructura familiar y la relación de los vínculos de descuido entre padres e hijos que componen la muestra tuvieron un patrón similar. Entre los grupos comparados se encontraron familias constituidas por uno solo de los progenitores; además, según manifestaron los hijos, resienten malos tratos y falta de apoyo y comunicación con sus padres, y en 8 de los 9 casos mencionaron situaciones de violencia intrafamiliar; el caso en que no hubo violencia doméstica sufrió la violencia social del asesinato

de un familiar. Estos jóvenes arguyen que, después del ingreso<sup>3</sup> a la pandilla, su familia los discrimina y se aleja de ellos por temor, y que solo los buscan para pedirles favores relacionados con la recuperación de pertenencias robadas por los mismos compañeros del familiar marero (con lo cual quizá se potencian las conductas criminales del pandillero). Un pandillero que creció en una familia nuclear comenta que la relación con sus parientes era buena, por lo que su incorporación a estos grupos no fue motivada por la situación familiar. Según la descripción de la vida en familia, un resiliente manifiesta que la autoridad y los consejos por parte de los padres en el hogar es algo importante que le ha permitido tener una vida prosocial. Otras veces, en la familia monoparental del resiliente la labor de inculcar valores y brindar consejos estuvo a cargo de una persona externa al grupo familiar, pues el trabajo de la madre hacía que esta se ausentara de la casa regularmente. Una resiliente comenta:

Mi mamá era la que se encargaba de que no nos faltara nada; además, [como] ella estudiaba, mi abuela era la que nos cuidaba. Entonces yo siento que, en la formación de los valores, y por ser lo que ahora somos, por ser personas de bien, o sea, hemos salido adelante, se lo debemos a mi abuela.

Por otra parte, el control excesivo de los padres obliga a los jóvenes, sobre todo si son del sexo femenino, a adoptar conductas de riesgo, como escaparse con amistades o establecer comunicación con extraños, por temor a las consecuencias de la desobediencia. Sin embargo, uno de los resilientes, aunque no pertenecía a una familia nuclear y además estaba expuesto a los malos ejemplos de libertinaje del pariente con más autoridad, logró mantener actitudes prosociales.

3 «Brincar» es el término que se utiliza en la jerga pandilleril para aludir a la iniciación de un individuo al grupo de pandilleros y que expresa en un acto delictivo o de maltrato físico propiciado por la pandilla. Algunos estudios describen que con las mujeres el acto de «brincar» significa ser violentada sexualmente por todos los miembros que componen una clica (18 o 20 miembros) o, según decisión de la aspirante, ser golpeada físicamente por todos los integrantes durante 13 minutos (en la MS) o 18 minutos (en el Barrio 18). Esta actitud es vista con más respeto entre los miembros de la mara. (PoLJUVE/ INTERPACE, 2011).

**Tabla 1.** Subcategorías en el contexto familiar de pandilleros, expandieros y resilientes

Categoría familiar	Pandilleros			Resilientes			Expandieros
	P1	P2	P3 ♀	R1 ♀	R2	R3	
Tipo de familia	Extensa	Monoparental	Monoparental	Nuclear	Nuclear	Monoparental	6 participantes 5 monoparentales y 1 nuclear
Número de hijo/a	Último	Primero	Última	Primera	Primero	Segundo	--
Condición de descuido relación padres-hijo/a	No	Sí	Sí	No padre sobrepotección	No	Sí	Todos los casos
Exposición a violencia doméstica	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Todos los casos
Clase social y económica de La familia	Media	Extrema pobreza	Media	Media	Media	Media alta	Pobreza y pobreza extrema
Religión de la familia	Cristianos	--	--	--	--	--	1 cristiano 5 no hubo dato
Percepción de apoyo, comunicación padres-hijo/a	Sí	No	No	No	Sí	No	En todos los casos no hubo apoyo ni comunicación
Malos ejemplos en la familia	No	Sí	No	No	No	Sí	--
Percepción de carencia afectiva	No	Sí	--	Sí	No	Sí	Todos los casos

Fuente: elaboración propia. ♀ Mujer pandillera 3 (P3) y mujer resiliente 1 (R1) fueron estudios de caso de género femenino. --: significa que no se obtuvo dato en la entrevista.



## 2 Contexto escolar

Las situaciones de deserción escolar y «escapadas» de clases aparecen entre los potenciadores de comportamientos delictivos en los jóvenes en estudios presentados por Morelato (2011). Las narrativas de vivencias muestran que, en los casos de los pandilleros entrevistados, estos factores de riesgo estuvieron presentes y explican de alguna manera su proceder, sus inicios en la vida forajida, clandestina. Sin embargo, uno de los casos no tuvo la posibilidad de acceder al sistema educativo y terminó en grupos de pandillas.

Para el grupo de resilientes, en las narraciones de vivencia de estos casos, al parecer el proyecto de vida y la escuela fueron un factor de protección que describe las conductas de resiliencia dentro de la dimensión del reto, el control interno y el comportamiento adaptable a las situaciones que se les presentan (Munizaga, 2009). Los casos de resiliencia mantuvieron un buen rendimiento académico o éxito escolar, sin deserciones ni «escapadas» de sus centros de estudio, según sus relatos; de tal manera, sus proyectos de vida manifiestos fueron alcanzados buenamente, logrando niveles de educación media (R3) y universitaria (R1 y R2) que determinaron en alguna medida sus comportamientos prosociales e incluso, probablemente, actuaron como factores protectores de su personalidad resiliente ante grupos pandilleriles.

## 3 Grupo de amigos/pares o relaciones amistosas

La capacidad para resistir a presiones de grupo es una habilidad social que no se encuentra muy desarrollada en la adolescencia y en la juventud, por lo tanto, se considera buen predictor de comportamientos delincuenciales y procesos de incorporación a pandillas juveniles (Vásquez, 2003), tanto como el nexo presencial de pandilleros en las esquinas o en la misma casa, como lo expresan los entrevistados. Iniciarse o ingresar en una mara es un suceso que requiere determinación, carácter y sufrimiento, pues para ser aceptado en el grupo es requisito «brincarse». Una vez brincados o iniciados, exponen:

Sí, los mejores momentos que tuve al interior de la pandilla... estar allí con los compañeros, disfrutando, fumando, salir a bailar, salir a robar, ir a matar, hacer cosas ilícitas... Ir a un nightclub, tener las hembras que uno quiere, de andar para arriba y para abajo, andar armado, era un lujo andar una 9 mm, una .38, bien... así veá...

Por otra parte, un factor protector importante en el grupo de resilientes fue ver a sus amigos o pares en malos pasos, como un ejemplo que no deberían seguir. La reflexión sobre estos riesgos y la urgencia de evitarlos también era inculcada o reforzada por los mismos padres. Para el caso de los resilientes R2 y R3, coadyuvó el gusto por el deporte, que en alguna medida promovió comportamientos saludables, compromisos, valores de responsabilidad, y marcó sólidos modelos de comportamiento (García-Vesga, 2013).

#### **4 Factores comunitarios/barrio o domicilio**

Para el siguiente análisis interpretativo de los factores comunitarios también se recurrirá a las vivencias de los entrevistados y a una síntesis sobre el tema, tomado de las mismas vivencias y expresado en la Tabla 2.

La marginación socioeconómica y otros aspectos comunitarios del lugar, como la desorganización social y la presencia de jóvenes pandilleros en las esquinas, entre otros, son factores de riesgo importantes que deben explorarse en los sujetos de estudio Vásquez (2003). Un pandillero comenta:

Bueno, el dinero a mí me hacía sentir bien, porque sabía que a mí las cosas no me hacían falta así, ¡ajá! Mi comida, mi ropa o cualquier cosa que yo quería, me lo compraba, se sentía alegre... me sentía alegre... El pandillero roba para vivir el día, él no va a tener una cuenta en el banco, no anda pensando en el día de mañana... solo el ahora, ni en el ahorro, ni nada...

En cuanto a los motivos de permanencia dentro de la pandilla, todos los casos manifiestan ser, entre muchos: dinero fácil, infundir

miedo, hacer lo que quieran sin restricción de nada, drogas, mujeres, en general, la forma de vida desaforada.

Los padres, en la medida de sus posibilidades y sabiendo en qué tipo de ambiente residían, optaron por tratar de adaptar a sus hijos al contexto. Esto fue uno de los factores que posibilitaron la conducta resiliente, aunque fuera mediante amenazas y control, pero otros optaron por salir del lugar.

La suntuosidad con que llevan la vida los miembros de las pandillas es quizá solo otro aspecto que tienta a los resilientes a entrar a estos grupos y que al final, después de reflexionar el asunto, vuelven a tomar la decisión de no incorporarse.

Las razones de abandono de maras o pandillas se resumen en los aspectos negativos de permanecer dentro de la estructura manifestados por los expandilleros. Algunas situaciones previas que impulsan a buscar la salida o abandono de las pandillas son el hecho de haber «caído», es decir, haber sido aprehendidos por la policía, y el sufrimiento que representó estar en un centro penitenciario, con el subsecuente abrazo a la religión, que, como manifiestan en sus relatos, es una de las dos maneras de desligarse de la estructura delincuencia. La otra forma es la muerte.

**Tabla 2.** *Ingreso, permanencia y abandono a la pandilla o mara de expandilleros y pandilleros criteriados*

Edad de ingreso	Edad actual	Permanencia (en años)	Factor que arguye como motivo para el abandono de la pandilla	Salida de pandilla al momento del estudio (años)
16*	29	8	Dios llegó a su vida a rescatarlo	5
16*	30	6	Conoció a Dios	8
17	46	26	Dios mandó un ángel y la palabra de Dios entró en su vida	7
15	32	15	Me acerqué a Dios cuando me faltaban dos años para cumplir mi pena	2
18	48	20	--	2
15	37	8	Porque aceptó a Cristo y quería ser pastor de la iglesia	14
12**	20	6	Se sintió defraudado por su pandilla por el asesinato de su amigo, lo capturaron y decide criteriarse	2
10	20	8	Ser condenado a 130 años de prisión (por homicidios agravados) y tener familia propia	2
22	25	1 aprox.	No quería seguir matando ni extorsionando	2

Fuente: elaboración propia.

-- No hubo dato

\* Edad en que fueron incorporados (brincados), pero en sus relatos de vivencia muestran que entre 13 a 15 años tuvieron relaciones o vínculos con pandillas o maras.

\*\* Pandillero criteriado que tuvo vínculos desde los 10 años sin ser incorporado formalmente hasta dos años después.

## Conclusiones y recomendaciones

### A. Conclusiones

Como ya se enunció, la teoría condujo a evaluar las categorías familia, escuela, amigos y zona domiciliar. Han convergido muy bien los sujetos-objeto de investigación, puesto que, al revisar sus relatos de vida, acusan mostrar problemas graves en una o más de las categorías analizadas. Asimismo, se ha podido notar que un individuo, habiendo caído dentro de una de las mencionadas categorías, su situación en las otras podría ser hasta inmejorable. Es decir, una sola categoría puede cumplir la condición de suficiencia para impulsar a un individuo a incorporarse a las pandillas.

El poder en general y la bonanza económica son dos aspectos que a través de la historia han demostrado ser capaces de hacer perder la perspectiva a la raza humana (Foucault, 1983), que se lanza a adquirirlos a ultranza. El «dinero fácil» y «detentar poder» son para los pandilleros los pilares de su conducta criminal; los resilientes sirven como «estándar» de comparación, como telón de fondo para visualizar a plenitud la «simpleza» de la conducta delincuencia de las pandillas.

El acto de un individuo de no iniciarse en las pandillas es ejecutado de manera tan consciente como el del individuo que toma la decisión de incorporarse a una pandilla, aun a su corta edad, donde prima una comprensión y la perspectiva infantil. Posiblemente, prevalezcan los principios, los valores y las experiencias guardadas ya en su recién formada personalidad.

Respecto al estilo de vida pandilleril se puede interpretar que si se tienen individuos expuestos a los factores predisponentes y a eso sumamos que «el fundamento de la cultura es la imitación y los procesos de imitación son predominantemente irracionales» (Palerm, 1997:62), la sociedad salvadoreña siempre tendrá gente nueva dispuesta a perpetuar el fenómeno social pandilleril.

Se puede concluir, respecto del proceso de reclutamiento de nuevos adeptos de las pandillas o maras, que la confianza es un bien de mucho valor entre sus miembros, y esta confianza se gana en la medida en que el interesado se vuelva, a los ojos del grupo, cómplice de delito o autor directo del mismo. La autoría del crimen tiene también otra significación: la atrocidad con la que se comete el ilícito es directamente proporcional al respeto ganado entre los demás miembros de la pandilla o mara.

Tanto como los resilientes tienen un discurso airoso explicativo de por qué tomaron sus «buenas» decisiones, también los pandilleros y los expandilleros ahora aprehendidos o exconvictos que cumplieron su pena buscan formar un discurso explicativo coherente que da cuenta de sus «malas» decisiones.

La narcoactividad es otro fenómeno social que parece fusionarse muy bien con el fenómeno social pandilleril, y aunque no figura en ninguno de nuestros casos como sujeto u objeto de estudio, puesto que en este sentido solo refirieron el consumo de narcóticos, para la interpretación del mismo no puede dejarse de lado debido a que es una variable que potencia las pandillas y hay que tenerla siempre presente.

Asimismo, para comprender el sentido ontológico del lenguaje pandilleril es necesario tener presente que en «todo grupo humano que habla en lenguaje propio, los individuos tienen que subordinar su autorregulación al habla de las regulaciones sociales de su idioma comunitario» (Elías, 1994:110), de tal manera que «es natural» que todo individuo se vaya adecuando al lenguaje para lograr comunicarse, sea pandillero o resiliente.

Un fenómeno curioso es el hecho de que tanto resilientes como mareros criteriados no refieren ninguna influencia religiosa, solo aisladamente unos conatos de incorporación a alguna iglesia. Por su parte, los expandilleros, para incorporarse a la vida prosocial, habiendo sido delincuentes profesos, tienen que buscar mecanismos que logren romper las reticencias y marginaciones que, por ser exconvictos, la sociedad les plantea; para ello, la religión les provee la inmejorable po-

sibilidad de «mimetizarlos» dentro de la sociedad. La alusión religiosa se explicaría en palabras de Wilhelm Pöl (1969) como:

Mecanismos de defensa que sirven para encubrir los impulsos, inclinaciones, actos y motivos que incurren en la censura del súper-yo. Contribuyen con ello a salvaguardar el aspecto del individuo ante la sociedad. Pero los impulsos deben interiorizarse también en formas derivadas orientadas a desviar o evitar modos de conducta y la disminución de valor y la conciencia de culpa a ellos vinculadas.

## **B. Recomendaciones**

Es claro que el problema en cuestión tiene una inextricable complejidad social y, por tanto, un apartado de recomendaciones en este estudio parece hasta pueril. Sin embargo, se han considerado estas:

- Brindar a los grupos expuestos al fenómeno pandilleril orientación, ayuda concreta y motivacional para llevarlos a evadir las pandillas y tomar una vida prosocial. Esto pasa por coordinar y gestionar esfuerzos con todos los actores sociales en general.
- Tomando en cuenta que la familia es un posible eje predisponente para la vida pandilleril, esfuerzos del tipo de trabajo social son necesarios para tamizar los hogares susceptibles y proveerles ayuda profesional preventiva.
- A la comunidad científica le corresponde por lógica asumir el estudio formal del lenguaje pandilleril. Los lingüistas son los llamados a «diseccionar» estos lenguajes para conocer su estructura, procesos semióticos y significados, puesto que hay que hablar el mismo idioma para conocerlos y actuar en consecuencia.
- La corporación policial tendrá que ser quien ataque frontalmente la obtención del «dinero fácil» por parte de las pandillas y la detentación del poder ejercido sobre la sociedad; los demás actores sociales tendrían que atacar los factores predisponentes y las causas en general.

## Fuentes consultadas

Corbetta, P. (2007). Metodología y técnicas de investigación social. Madrid, España: McGraw Hill/Interamericana.

Elías, N. (1994). Teoría del símbolo. Un ensayo de antropología social. España: Editorial Península (p. 110).

Foucault, M. (1983). «El sujeto y el poder», epílogo de Más allá del estructuralismo y la hermenéutica (2.a ed.). Chicago, ee. uu: Chicago University Press.

García-Vesga, M. C. y Domínguez-de la Ossa, E. (2013). «Desarrollo teórico de la resiliencia y su aplicación en situaciones adversas: una revisión analítica». Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales, Niñez y Juventud, 11 (1) (pp. 63-77).

INTERPEACE-POLJUVE (2009). «Violencia juvenil, maras y pandillas en El Salvador. Documento para discusión». El Salvador (p. 36.)

Jerez, B. (2009). «La resiliencia desde el enfoque del paradigma de la complejidad». Comunidad del pensamiento complejo. Argentina, julio de 2009. Disponible en: <http://www.pensamiento-complejo.com.ar>

Morelato, G. (2011). «Resiliencia en el maltrato infantil: aportes para la comprensión de factores desde un modelo ecológico». Revista de Psicología, 29 (2) (pp. 203-224 2011).

Moreno Espinoza, L. Á. (2009). «Comunicación efectiva para el logro de una visión compartida». Revista Culcyt Comunicación, año 6, número 32.

Munizaga, A. M. (2009). «Potencialidades del enfoque de factores de riesgo. Breve revisión de las teorías del delito». Revista



Conceptos, 12, diciembre de 2009. Santiago de Chile: Fundación Paz Ciudadana.

Palerm, Á. (1997). Introducción a la teoría etnológica. Treinta lecciones (3.a ed.). México d. f.: Universidad Iberoamericana.

Pöll, W. (1969). Psicología de la religión. Barcelona, España: Herder (p. 285)

Rivera Clavería, J. (2011). El crimen organizado. Guatemala: Instituto de Estudios en Seguridad.

Rodríguez Gómez, G.; Gil Flores, J.; García Jiménez, E. (1996). Metodología de la investigación cualitativa. Málaga, España: Ediciones Aljibe.

Taylor, S. J. y Bogdan, R. (1987). Introducción a los métodos cualitativos de Investigación. La búsqueda de significados. Barcelona, España: Editorial Paidós (p. 152).

Vásquez, C. (2003). Delincuencia juvenil. Consideraciones penales y criminológicas. Madrid, España: Colex.

Vinaccia, S.; Quiceno, J. M.; Moreno San Pedro, E. (2007). «Resiliencia en adolescentes». Revista Colombiana de Psicología [en línea], núm. 16, 2007 [Fecha de consulta: 1 de septiembre de 2014] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articuloa?id=80401610>>ISSN 0121-5469)

## Cooperación científica del claustro docente para guiar las investigaciones de la maestría en salud pública de la facultad de medicina

Cómo citar este artículo: E. Mazariego-Flores, "Cooperación científica del claustro docente para guiar las investigaciones de la maestría en salud pública de la facultad de medicina" Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo, vol. 22 (1), pp. 51-59, enero. 2022.

DOI: <https://doi.org/10.19053/1900771X.v22.n1.2022.14455>

Edwin Mazariego Flores<sup>4</sup>

E-mail: [edwin.mazariego@ues.edu.sv](mailto:edwin.mazariego@ues.edu.sv)

Universidad de el Salvador. Facultad de Medicina, Escuela de Posgrado

### Resumen

Este estudio es un fragmento de otro documento que ha resultado de una tesis doctoral en educación superior donde, habiéndose determinado, inicialmente, la variable "cooperación científica del claustro docente para la orientación tutorial de las investigaciones de la maestría en salud pública de la Facultad de Medicina", se trazó por objetivo determinar cómo y cuánto se realiza; asimismo, determinar las dimensiones e indicadores, los parámetros y sus reglas de decisión; con un abordaje metodológico de tipo mixto, rasgos generales, contextuales cualitativos y la cuantificación de la frecuencia de las dimensiones de la variable en estudio. Al analizar e interpretar los datos obtenidos se concluye, que: La cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones en la maestría en salud pública, al promediar los resultados de los tutores y los tutorados, queda establecido en  $\bar{x}$  3.7, medianamente frecuente: ocurre entre el 41 y el 60 % de las acciones. Por tanto, y teniendo en cuenta los criterios cualitativos aportados por los sujetos de la investigación, se afirma la necesidad de la implementación de una estrategia de cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones que mejore la formación en el contexto de la Maestría en Salud Pública en la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.

**Palabras clave:** cooperación científica, investigación, maestría, salud pública.

## Abstract

This study is a fragment of another document that has resulted from a doctoral thesis in higher education where, having initially determined the variable “scientific cooperation of the teaching staff for the tutorial orientation of the research of the master’s degree in public health of the Faculty of medicine”, its dimensions and its indicators, the parameters and its decision rules; When analyzing and interpreting the data obtained, it is concluded that: Scientific cooperation for the tutorial orientation of research in the master’s degree in public health, averaging the results of tutors and tutors, is established at x-3.7, Moderately frequent: occurs between 41 and 60% of the shares. Therefore, and taking into account the qualitative criteria provided by the research subjects, the need for the implementation of a scientific cooperation strategy for the tutorial orientation of research to improve training in the context of the Master in Health is affirmed in the Faculty of Medicine of the University of El Salvador.

**Key words:** scientific cooperation, research, master’s degree, public health.

## 1. Introducción

Se describen a continuación los supuestos teóricos que se han elegido como fundamentos de la cooperación científica para la orientación tutorial de investigaciones de maestría, destacando la esencia de los procesos y de los actores involucrados. Por lo anterior, las universidades tienen el compromiso de mejorar constantemente el proceso educativo de cara a la sociedad a la que se deben, en este sentido, es necesario: ser plenamente consciente de la importancia de la Educación Superior en el desarrollo de nuestras naciones, así como, en el porvenir de cada uno de los alumnos que depositan en ella sus perspectivas de crecimiento humano y profesional, en esencia, esto se convierte en un compromiso social que la Universidad de hoy debe fomentar en sus aulas [1].

En primer lugar, el maestrando realiza la elección inicial del tema de investigación y con ello, en seguida, la coordinación académica de la maestría asigna un tutor de la tesis, con el fin de orientar el proceso de investigación para llevarlo hasta la realización del informe final, el cual será expuesto y defendido por el maestrando ante un tribunal evaluador, luego de cumplir con todos los requisitos.

En segundo lugar, se debe disponer a realizar una investigación por parte del maestrando, en efecto, esta depende de un complejo entramado de factores externos e internos, motivacionales intrínsecos y extrínsecos. En este sentido, es competencia de las instituciones formadoras obrar en función de la minimización de aquellos factores que obstaculizan la finalización de la maestría.

En concordancia con lo anterior, los fundamentos educativos adoptados para este estudio, específicamente, para la Maestría en Salud Pública, están dirigidos a la formación final del proceso de la Maestría, en el momento en que los maestrandos están enfocados en superar una tesis que los promueva a la obtención del posgrado; que, asimismo, tenga en cuenta el medio social y cultural en que se desarrolla, de tal manera que, se logre formar individuos capaces de impactar positivamente en la sociedad, a través de sus aportes científicos competentes y oportunos que respondan a las necesidades del contexto.

En este sentido, es precisamente, la cooperación científica del claustro, que logrará la unidad formal de estos aspectos señalados en una de las leyes generales de la pedagogía como ciencia en donde la “ley de la unidad entre objetivos, desarrollo del proceso y sus resultados” [2], pues tiene en cuenta los antecedentes del problema abordado en este estudio. Allí se plantean dos premisas fundamentales para alcanzar el desarrollo investigativo: la socialización de la persona y, la comunicación como resultado de la interacción continua entre las condiciones internas y las condiciones de vida externas, para su desarrollo. Como lo planteado en la teoría Histórico- cultural [3], quien argumenta, que:

“Para estudiar, comprender e intervenir en la subjetividad humana es imprescindible contar con la participación, disposición, implicación y compromiso de todos. Se deviene en subjetividad en la relación de cooperación con los otros, por tanto, en la unidad de lo individual y lo colectivo está la posibilidad objetiva de su transformación” p. 27 [4]

El claustro de la Maestría en Salud Pública se verá fortalecido y, subsecuentemente, volverá eficiente el aprendizaje de los maestrandos, evidenciado en tesis o investigaciones de elevada calidad por cuanto, “el conocimiento es definido como un proceso de negociación o construcción conjunta de significados, y esto vale para todo proceso de enseñanza aprendizaje” p.224 [5]

Finalmente, teniendo en cuenta todo lo anterior como premisas, siempre hará falta un componente esencial sin el cual no es posible alcanzar aprendizajes desarrolladores, es decir, en última instancia, el aprendizaje escolar es un aspecto más del comportamiento humano y, por tanto, necesita de una fuerza motivacional para mantenerse en el tiempo [6].

Así también, el claustro tiene por responsabilidad mediar circunstancias y brindar orientaciones para lograr ese impulso motivacional en los maestrandos, que los haga soñar con alcanzar la maestría o salir airoso del compromiso que adquirieron al matricularse en la misma, como motivación base; empero, el desarrollo de la formación va más allá, es convertirse en investigador creativo, innovador en el área de la salud pública y sobre todo en ser en agentes activos que resuelven problemas sociales auténticos.

## **Referentes conceptuales**

El diccionario léxico hispano define Cooperar como “Hacer algo para que junto a la acción o el esfuerzo de otras personas se consiga un determinado resultado” y, por otra parte, el significado de Científico como: “Que se ajusta a los principios y métodos de la ciencia o está relacionado con ella” [7]. Así planteado, el claustro de la Maestría en Salud Pública vendría a conformar el grupo de personas que actúan en

conjunto por un mismo fin, el mismo está representado por la orientación conducente a la mejora cualitativa de las investigaciones que los maestrandos deben desarrollar y con ello alcanzar la titulación.

En este caso, la cooperación es el resultado de una estrategia de trabajo conjunto que se vale de una serie de métodos para facilitar la consecución de un objetivo: mejorar las competencias investigativas de los maestrandos en salud pública y, en consecuencia, la mejora cualitativa de las tesis que realizan; en suma, la cooperación es fundamental para la vida en sociedad, debido a que es una forma más eficiente de gestionar los asuntos en función del interés colectivo.

Colaboración, coordinación y cooperación son conceptos que entrañan en sí mismos el trabajo de grupo y que, para el caso de las tutorías, bien podría referirse a la unidad tutor-estudiante. Con base en lo anterior, para la realización de un estudio científico de tesis, la visión científica se limita al aporte del experto o tutor y el novel maestrando. Es fundamental entonces, someter las investigaciones y sus procesos, al criterio de otros expertos y otros maestrandos con el fin de alcanzar aprendizajes desarrolladores que, consecuentemente, enriquezcan los trabajos científicos de tesis con mejoras sustantivas en términos cualitativos.

Los referentes de la cooperación científica son abundantes. Diversos estudios científicos han adoptado la cooperación científica como estrategia de mejora para el aprendizaje, comportando ciertos matices que hacen diferencias, por ejemplo: En [8] se hace un estudio sobre mejorar los aprendizajes estudiantiles en el proceso de formación universitaria, allí se plantea lo que se denomina cooperación docente y argumenta que la relación cooperativa y la coordinación “producen un beneficio de aprendizaje en los sujetos participantes, estudiantes y docentes, y también proporciona un espacio de desarrollo personal-profesional y organizativo, al tratarse de un tipo de actividad producida de forma colectiva o cooperativa” p. 457. Sin embargo, le confiere al estudiante un papel de beneficiario, con poco protagonismo cooperativo.

Por otro lado, la propuesta de cooperación en educación de [9], aunque exhaustiva en el abordaje de la cooperación en educación, al tomar la cooperación a nivel administrativo, docente, estudiantil, familiar y social, es bastante abstracta al plantear el ejercicio de la misma. No obstante, también ha sido utilizada la cooperación científica conducente a mejorar la formación de los estudiantes, vinculando a la comunidad y la familia, la escuela [10, 11]. Así también, la cooperación en la formación de Licenciados en Lengua Española para no Hispanohablantes de [12] constituye otro referente que valida la cooperación científica como una estrategia efectiva para alcanzar objetivos educativos.

En este mismo orden de ideas, la cooperación desde la perspectiva en [13] se concibe como una estrategia de aprendizaje organizacional para los claustros docentes con miras a las mejoras cualitativas del ejercicio profesional, donde la cooperación debe ser adoptada como cultura. De igual forma, en [14] se plantea la cultura de cooperación. De tal forma que, la cooperación científica es referida a las co-tutorías de tesis [15] en España significa el concepto limitándolo a las tutorías de tesis, pero referido a la asignación de co-directores de tesis.

En el mismo sentido, pero con investigadores experimentados, en Latinoamérica la producción de investigaciones identifica la disminución de artículos científicos calzados por un solo autor y concluyen: “que el porcentaje de textos individuales se ha reducido en ocho puntos respecto del año anterior (de 63 % a 55 %) y un aumento del porcentaje de artículos con tres autores que pasa del 7 % en 2009 al 14 % en 2010” [16].

Del mismo modo, la cooperación científica en educación refiere tener éxito hasta en temas complejos de formación, como lo demuestra una tesis doctoral [17] que aborda la cooperación para el tratamiento de la creatividad en el proceso de enseñanza-aprendizaje de la filosofía. Es importante revisar que, hacia finales del siglo XX, [18] planteaba la idea de cooperación científica para el crecimiento profesional de los docentes, como estrategia ineluctable de mejora.

La revisión de la literatura hecha, refiere ventajas sustantivas a nivel cualitativo y cuantitativo de las investigaciones, cuando son realizadas en cooperación, ya sea internacional, interinstitucionales internas de país o entre grupos de profesionales de la misma área o distintas áreas dentro de una institución. Un estudio realizado en una universidad cubana reporta que existe una proporcionalidad directa entre cooperación y el aumento de producción científica de calidad [19]. Además, [20] acotan sobre los beneficios generados de la cooperación, como lo es el impacto que esta cooperación produce al mejorar la calidad o visibilidad de las publicaciones. En consecuencia, la producción conjunta permite la mejora, visibilidad e impacto académico-investigativo.

Por otra parte, acorde al referente teórico del tutor, en condiciones óptimas, un orientador o tutor de tesis tiene por funciones generales realizar con el maestrando, el investigador [21] las siguientes: la evaluación temprana y realista de las necesidades del estudiante; foco pedagógico, clarificación de expectativas y límites; desafío académico y valoración; gestión del conocimiento, reuniones frecuentes, revisión del trabajo escrito, realimentaciones inmediatas y constructivas; advertencia de las señales de peligro, promoción del acceso a la cultura de la investigación y, aculturación en una comunidad de práctica.

Así mismo, [21] afirma que, aún las funciones no son alcanzadas, satisfactoriamente, y lo que propone no se logra plasmar en los documentos construidos, aquí se evidencia, una alta perspectiva del tutor y, marginalmente, se presenta la visión de los maestrandos. No obstante, otras miradas al objeto de estudio, desde diferentes perspectivas pueden brindar mayor profundidad y objetividad a los resultados de las investigaciones.

En consecuencia, la asignación de tutor de tesis es de cardinal importancia para que el maestrando logre, eventualmente, la realización y defensa exitosa de la tesis, en tanto que el proceso de realización de este trabajo investigativo, tal como está diseñado, depende en buena parte de las disposiciones, orientaciones y buen tino del tutor asignado.



Por otro lado, la cualificación formativa es un objetivo permanente de las universidades, al respecto, la agenda 2030 para el desarrollo sostenible para Latinoamérica y el Caribe [22], plantea como prioridad “La construcción de capacidades a través de la educación de calidad, la universalización de la protección y la economía del cuidado, la creación de empleo con derechos y la provisión de mejores bienes públicos” (p.11)

Con base en lo anterior, es importante tener en cuenta que la formación de posgrado exige trascender la actividad laboral ceñida al “saber hacer”, ya que son necesarios profesionales de posgrado capaces de incidir positivamente y “de oficio” en sus entornos sociales, ocupándose de los problemas de la realidad con una visión aguda y profundidad científica para contribuir a la solución de los mismos.

Usualmente, a través de los estudios académicos de grado y posgrado la figura de profesor o docente transita durante toda la formación y es hasta que el estudiante inicia el proceso de realización de la tesis que se habla de la figura de tutor, al menos en El Salvador. En consecuencia, el concepto de tutor comporta diversos matices en su significado acorde de las diversas maneras de asumir o realizar la labor, es decir, de orientar la tutoría.

Una acepción general de tutoría es la de [23] quien la plantea como una tarea integrada en la labor docente, que implica una interacción personalizada del profesor tutor con el alumnado, con la finalidad de hacer un seguimiento del proceso de aprendizaje y definir su proyecto personal de titulación. Es de notar la coherencia que tiene esta acepción en función de la optimización del proceso enseñanza-aprendizaje; empero al limitarse a la perspectiva que posee el tutor del PEA, adolece por otra parte, de la riqueza que supone el aprendizaje grupal.

En [24], los investigadores plantean siete modalidades de tutoría en Educación Superior en el contexto iberoamericano, la de interés aquí, es una modalidad de tutoría denominada de investigación que de manera sucinta la definen como: “Asesoramiento individualizado

en la elaboración de un trabajo de investigación en el grado, en el posgrado o en el doctorado” p. 385.

Como se aprecia no supera la necesidad del aprendizaje grupal, pero en el desarrollo del estudio, [24] ya han advertido la necesidad de la instauración de “un sistema organizativo y funcional que permita establecer la colaboración y la coordinación de las actividades orientadoras y de la acción tutorial entre los diversos agentes implicados, y la coordinación a fin de conseguir la máxima eficacia” p. 394.

Para el trabajo académico formativo en educación superior, múltiples estudios han demostrado que el aprendizaje mejora en términos cualitativos y cuantitativos cuando es realizado en grupos cooperativos “(...) la interrelación entre los alumnos, entre alumnado y profesorado y entre profesores aumenta considerablemente el desarrollo del aprendizaje” [25]; también en la investigación hecha por la comunidad europea se plantea: “El aprendizaje cooperativo como una de las modalidades idóneas para la formación del alumnado universitario” [26] p. 395.

La Educación Superior tradicional que enfatizaba en la formación conducente al desempeño laboral eficiente, a ser buenos consumidores de conocimientos, ha perdido brío a causa de las exigencias que las sociedades ahora plantean [27]. En consecuencia, los actos educativos de formación en educación superior deben orientarse a forjar en el estudiante la mencionada autodeterminación con responsabilidad social; acentuándose en los procesos formativos de posgrado durante toda la formación, la cual también incluye el proceso de realización y defensa de la tesis de graduación.

La realización de la tesis representa para los maestrandos, probablemente, el último obstáculo académico a vencer. Por esta razón, es responsabilidad del cuerpo docente de los institutos de formación superior, orientar o dirigir a los estudiantes a través de consejos y enseñanza oportuna que los lleven al logro o superación de la realización exitosa de la tesis de grado o posgrado.

La tutoría investigativa es la estrategia didáctica de probado éxito para que los maestrandos cumplan las etapas de investigación: exploración empírica de la realidad, planificación, ejecución, evaluación, elaboración del informe de investigación, socialización o comunicación de los resultados de la tesis y con ello, su formación. No obstante, es necesario mejorarla, cualificarla, de tal manera que, se logren elevar las tasas de terminación de la maestría y, asimismo, los aprendizajes desarrolladores, expresado o evidenciado a través de la cualificación de las tesis con las que son promovidos los maestrandos.

En el trabajo cooperativo se conforman grupos, que para este caso son los tutores de las tesis y sus maestrandos, al constituir un grupo trabajarán en el logro de una tarea común: la realización de una investigación que culmine con la tesis de graduación con un elevado rigor científico, por supuesto, cada quien cumpliendo su papel.

Sin embargo, la puesta en común de los diversos temas de tesis, proveería la cooperación científica tanto del claustro docente, como de los pares maestrandos, acción que redundaría en la mejora cualitativa del proceso de investigación que desarrollan.

Finalmente, tomando en consideración todos los aspectos disertados sobre las obras y autores consultados que han conseguido sistematizar y fundamentar con acierto, desde sus perspectivas, la cooperación científica; no se ha encontrado en la literatura estudiada una definición concreta para el objeto de esta investigación, lo cual conduce a plantear una definición que precise el objeto de este estudio científico.

Se define en este estudio la cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de Maestría en Salud Pública como: colaboración en la toma de decisiones, responsabilidad compartida y la realización armónica de las tareas por parte del claustro (tutores, profesores, directivos y estudiantes) en función de establecer niveles de ayuda que van desde indicar las acciones a realizar, precisarlas con profundidad y poner ejemplos de cómo hacerlo, en el contexto de la determinación del problema científico y demás componentes del

diseño, la sistematización teórico-metodológica, el diagnóstico del objeto de estudio, la conformación-aplicación de la propuesta, la elaboración del informe y la socialización de los resultados.

En consecuencia, son enunciadas las siguientes dimensiones y sus indicadores, con sus direcciones de análisis:

Cooperación del claustro: colaboración en la toma de decisiones, responsabilidad compartida y realización armónica de las tareas durante la determinación del problema científico y demás componentes del diseño, la sistematización teórico-metodológica, el diagnóstico del objeto de estudio, la conformación-aplicación de la propuesta, la elaboración del informe y la socialización de los resultados.

Orientación tutorial: establecer niveles de ayuda al indicar las operaciones investigativas a realizar, precisar con profundidad las mismas y/o poner ejemplos de cómo desarrollarlas durante la determinación del problema científico y demás componentes del diseño, la sistematización teórico-metodológica, el diagnóstico del objeto de estudio, la conformación-aplicación de la propuesta, la elaboración del informe y la socialización de los resultados.

## **2. Metodología**

Esta investigación presenta un enfoque metodológico mixto donde se entremezclan métodos cualitativos y cuantitativos en función de una visión más abarcadora y completa de la realidad. En consecuencia, los métodos utilizados en la investigación se describen someramente a continuación:

Como métodos de nivel empírico fueron utilizados, la observación científica, análisis documental, entrevista y encuesta. Para el análisis de las entrevistas se utilizó para el procesamiento de los datos el software Atlas.ti 8. Ahora bien, como métodos del nivel teórico se utilizaron: la sistematización, el inductivo-deductivo, el analítico-sintético y el sistémico estructural-funcional.

Además, se utilizó para el procesamiento de los datos la estadística descriptiva: la media aritmética como medida de tendencia central, así como, el cálculo y análisis de frecuencias absoluta y relativa para la caracterización de la variable y sus dimensiones.

La población para esta investigación está conformada por el claustro de la Maestría en Salud Pública, constituidos de la siguiente manera: Dos docentes de planta encargados (Dirección y coordinación de la Maestría en Salud Pública) y seis docentes contratados para impartir las asignaturas o módulos de formación y además para tutorar investigaciones. El número de contratados es acorde con el número de estudiantes; y finalmente, nueve maestrandos de la cohorte 2019 quienes están en proceso de realización de tesis, también, dos en proceso de graduación y dos recién graduados. Dado que el número de sujetos a investigar es pequeño y todos pueden aportar información valiosa, se selecciona de forma intencional toda la población.

### **3. Resultados**

La situación actual investigada de la maestría en salud pública desarrollada en tres áreas de formación de la Salud Pública, a saber: Epidemiología y Ciencias Ambientales; Política y Gerencia Estratégica en Salud; y Promoción, Educación en Salud y Salud Comunitaria, evidenció a través de las técnicas utilizadas los rasgos generales siguientes:

#### **Observación no participante**

Las reuniones llevadas a cabo por el claustro están relacionadas a la coordinación de aspectos administrativos asociados a la distribución de carga laboral o información general del proceso tutorial de las tesis. Los aspectos académico-investigativos relacionados con las tesis están confinado al binomio tutor/tutorados y, en consecuencia, ninguna reunión se planifica para que los maestrandos muestren los avances de sus estudios. La cooperación científica del claustro de tutores para con los maestrandos no se realiza, sino únicamente dentro del binomio tutor / tutorados.

## Entrevistas semiestructuradas

Los tutores plantean reunirse con la administración en escasas ocasiones, en función de que las normas o manuales, ya tienen contempladas aquellas actividades que han de realizarse. Además, son bien vistas las capacitaciones que son impartidas a tutores y maestrandos a fin de la mejora cualitativa del proceso, con lo cual, las reuniones entre la administración y los tutores, son percibidas como menos necesarias y cuando son realizadas, lo hacen individualmente entre el tutor interesado en algún asunto y la coordinación.

Ahora bien, las funciones que los tutores expresan realizar están cargadas de abstracciones relacionadas al “deber ser”, más que a las funciones desarrolladas. En donde, y según lo socavado, las expresiones de los tutores muestran que no se reconoce la cooperación científica como función que ellos deban desarrollar entre los demás miembros del claustro, ni con estudiantes que no están asignados a ellos; asimismo demuestran no tener claridad respecto de la secuencia lógica de procedimientos a desarrollar durante el proceso tutorial.

El proceso instituido únicamente permite que los trabajos de tesis sean observados o corregidos hasta el final, donde un tribunal evaluador realiza las observaciones que después de ser corregidas son expuestas por los maestrandos en un acto público de defensa.

Con la encuesta se logró determinar la condición actual de las dimensiones y sus variables en estudio: Cooperación del claustro y orientación tutorial, se muestra a continuación un resumen de los resultados en la tabla siguiente:

**Tabla 1.** *Cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones en la maestría en salud pública según codificación y parametrización*

	Maestrandos	Tutores
Coop. del claustro	$\bar{x}$ 3.8	$\bar{x}$ 3.3
Variables		
Colaboración en la toma de decisiones	3.6	4
Responsabilidad Compartida	3.8	3
Realización armónica de las Tareas	3.9	3
Orientación tutorial	$\bar{x}$ 3.8	$\bar{x}$ 4.1
Variables		
Se indican las operaciones a realizar	4.05	3.9
Se precisan con profundidad	3.9	4.45
Se ponen ejemplos	3.6	4
Cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones en la maestría en salud pública	3.8	$\bar{x}$ 3.7

1. No es frecuente: ocurre en menos del 10 % de las acciones.
2. Poco frecuente: ocurre entre el 11 y el 40 % de las acciones.
3. Medianamente frecuente: ocurre entre el 41 y el 60 % de las acciones.
4. Frecuente: ocurre entre el 61 y el 80 % de las acciones.
5. Muy frecuente: ocurre entre el 81 y el 100 % de las acciones.

## 4. Conclusiones

Habiéndose determinado inicialmente la variable, dimensiones e indicadores de la misma, los parámetros y reglas de decisión; al analizar e interpretar los datos obtenidos se concluye, que: La cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones en la maestría en salud pública, promediando los resultados de los tutores y los tutorados, queda establecido en  $\bar{x}$  3.7, Medianamente frecuente: ocurre entre el 41 y el 60 % de las acciones. De acuerdo con lo anterior y, teniendo en cuenta los criterios cualitativos aportados por los sujetos de la investigación, se reafirma la necesidad de mejorar la formación en el contexto de la Maestría en Salud Publica en la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, puntualmente, en aspectos de formación investigativa, consignada en el currículo aprobado.

## Referencias

1. Z. N. Achón, I. O. Ramos & O. M. Pérez (2006). “La formación profesional en la universidad de hoy: De la educación a la autoeducación”. 8. Revista Iberoamericana de Educación. ISSN: 1681-5653
2. F. A. Fernández, S. R. Fernández, M. F. Lavastida & S. Fernández (2007). Didáctica: Teoría y práctica (Segunda). Editorial Pueblo y Educación.
3. C. Pérez Maya & L. López Balboa (1999). “Las habilidades e invariantes investigativas en la formación del profesorado. Una propuesta metodológica para su estudio”. Editorial Universitaria. Disponible en: <http://site.ebrary.com/id/10317250>
4. M. Carnero Sánchez (2019). Psicología para la Educación Superior (Primera). Universitaria Félix Varela.
5. N. Roselli (2016). “El aprendizaje colaborativo: Bases teóricas y estrategias aplicables en la enseñanza universitaria. Propósitos



- y Representaciones”. Vol. 4 (1), 219-280. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20511/pyr2016.v4n1.90>
6. M. Carretero (1997). *Constructivismo y educación*. Progreso S.A. de C.V.
  7. Diccionario léxico hispano (1973). En *Diccionario léxico hispano*: Vol. Primero (p. 690). W.M. Jackson, Inc., Editores.
  8. M. J. B. Martínez, M. Á. M. Yus, & M. P. Currás (2013). Coordinación docente e interdisciplinariedad: Análisis de su contribución a la adquisición de competencias docentes y discentes. *REDU: Revista de Docencia Universitaria*, 11(2), 443.
  9. R. Escorcía-Caballero, & A. Gutiérrez-Moreno (2009). “La cooperación en educación: Una visión organizativa de la escuela. *Educación y Educadores*”, Vol. 12(1), Article 1. <https://educacionyeducadores.unisabana.edu.co/index.php/eye/article/view/762>
  10. A. Meneses (2017). Modelo para la cooperación familia-escuela politécnica en los procesos de diagnóstico integral y formación del proyecto de vida profesional. Universidad de ciencias pedagógicas “Enrique José Varona” Facultad de Ciencias Técnicas.
  11. A. Meneses, M. Carnero Sánchez and M. Arzuaga (2016). Cooperación Familia-Escuela Politécnica en los procesos formativos. Vol. 14(1). Disponible en: <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu>
  12. S. Xin (2020). La cooperación en la formación de Licenciados en Lengua Española para no Hispanohablantes. Universidad de La Habana. Centro de estudios para el perfeccionamiento de la Educación Superior.
  13. A. Villa & C. Yániz (1999). Aprendizaje organizativo y desarrollo profesional. *Revista de curriculum y formación del profe-*

- sorado. Disponible en: [http:// www.ugr.es/local/recfpro/Rev31ART3.pdf](http://www.ugr.es/local/recfpro/Rev31ART3.pdf)
14. J. Sebastián (2000). La Cultura de la Cooperación en la I+D+I. Sala de lectura CTS+I. <https://www.oei.es/historico/salactsi/sebastian1.htm>
  15. J. C. M Recio, M. J. M. Pestaña & M. F. B. López (2012). Producción y dirección de tesis doctorales sobre publicidad en la universidad española (1971-2010). Revista española de Documentación Científica, Vol. 35(3), 433-452. <https://doi.org/10.3989/redc.2012.3.890>
  16. A. C. Esparcia (2011). Investigación e investigadores. Las revistas científicas como instrumento de comunicación. Vivat Academia, 1002-1017. <https://doi.org/10.15178/va.2011.117E.1002-1017>
  17. P. Kaparacate (2018). Estrategia didáctica- metodológica para el tratamiento de la creatividad en el proceso de enseñanza-aprendizaje de la filosofía en el segundo ciclo de la secundaria angolana. Universidad de ciencias pedagógicas "Enrique José Varona" Facultad de Ciencias Técnicas.
  18. A. A. Glatthorn (1987). Cooperative professional development: Peer-centered options for teacher growth. Educational leadership, pp. 31-35.
  19. G. Ronda (2011). Influencia de la cooperación en la producción científica de investigadores de la provincia de Holguín, Cuba: Análisis cuantitativo 1980-2009. Vol. 42(1), pp.15-22.
  20. D. de Filippo, R. Barrere & I. Gómez (2010). Características e impacto de la producción científica en colaboración entre Argentina y España. Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad- CTS, Vol. 6(16).
  21. H. E. D. Anglat (2011). Las funciones del tutor de la tesis en educación. Revista mexicana de investigación educativa, Vol.

- 16(50), pp. 935-959. CEPAL. (2015). Agenda 2030 y los objetivos de desarrollo sostenible. Una oportunidad para América Latina y el Caribe. Fundación Santillana. Universidad de Alcalá/IDE.
22. CEPAL. (2015). Agenda 2030 y los objetivos de desarrollo sostenible. Una oportunidad para América Latina y el Caribe. Fundación Santillana. Universidad de Alcalá/IDE.
23. P. R. Álvarez Pérez (2013). (PDF) [Online] La función tutorial del profesorado universitario: Una nueva competencia de la labor docente en el contexto del Espacio Europeo de Educación Superior. ResearchGate. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/308330960\\_La\\_funcion\\_tutorial\\_del\\_profesorado\\_universitario\\_una\\_nueva\\_competencia\\_de\\_la\\_labor\\_docente\\_en\\_el\\_contexto\\_del\\_Espacio\\_Europeo\\_de\\_Educacion\\_Superior](https://www.researchgate.net/publication/308330960_La_funcion_tutorial_del_profesorado_universitario_una_nueva_competencia_de_la_labor_docente_en_el_contexto_del_Espacio_Europeo_de_Educacion_Superior)
24. C. Lobato Fraile & N. Guerra Bilbao (2016). La tutoría en la Educación Superior en Iberoamérica: Avances y desafíos. 52/2, pp.379-398. <http://dx.doi.org/10.5565/rev/educar>
25. N. Grané Teruel, A. Bonet Jornet, M. T. Caballero Caballero, J. C. Cañaveras Jiménez, M. F. Gimenez Casalduero et al (2011). Coordinación docente en la Facultad de Ciencias. 2337-2348.
26. M. Fuentes-Guerra Soldevilla, M. del M. García Cabrera, V. J. Llorent García & M. Á. Olivares García (2012). “La coordinación docente universitaria desde la percepción del alumnado”. REDU. Revista de Docencia Universitaria, Vol. 10(2), pp. 395. <https://doi.org/10.4995/redu.2012.6115>
27. M. Sospedra & D. Rosa (2015). “La formación docente universitaria en Cuba: Sus fundamentos desde una perspectiva desarrolladora del aprendizaje y la enseñanza”. Estudios pedagógicos (Valdivia), Vol. 41(1), pp. 337-349. <https://doi.org/10.4067/S0718-07052015000100020>

# Experiencia y percepción investigativa de los docentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador

## Perception and Research Experience of the Teachers to the Medical Faculty of The Salvador University

Edwin Mazariego Flores<sup>1</sup> \* <https://orcid.org/0000-0003-1396-6026>

Maikel Carnero Sánchez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0661-7303>

<http://scielo.sld.cu/pdf/reds/v10n1/2308-0132-reds-10-01-e29.pdf>

<sup>1</sup>Universidad de El Salvador (UES), Facultad de Medicina, Unidad de Ciencias Básicas, El Salvador

<sup>2</sup>Centro de Estudios para el Perfeccionamiento de la Educación Superior (CEPES), Universidad de La Habana, Cuba

\*Autor para correspondencia [edwin.mazariego@ues.edu.sv](mailto:edwin.mazariego@ues.edu.sv)

Enviado: 17/10/2021

Aprobado: 9/12/2021

### Resumen

El estudio se planteó caracterizar la población docente de la Facultad de Medicina con relación a su experiencia investigativa y a su percepción del servicio de formación en investigación. A través de un instrumento tipo cuestionario, fue enviado a la dirección del correo institucional a la población total de docentes que laboraba en la Facultad de Medicina, en la aplicación Google: Formularios. Se aceptaron respuestas durante el mes de marzo de 2021. Fueron respondidos 165 cuestionarios de un total de 315 docentes con contrataciones de Ley de salarios y Permanentes, donde se obtuvo que es una población docente principalmente experta con más de cinco años en la docencia, con poca experiencia investigativa y con una baja tasa de estudios de posgrado. Los docentes mayoritariamente perciben la competencia investigativa como un asunto curricular innecesario;

no obstante, ejercen la formación investigativa en su mayoría. A un reducido número de estos se le asigna la asesoría de los trabajos de grado o se nombra como tribunal evaluador para las defensas estudiantiles de tesis. Los docentes en general perciben problemas de calidad en el nivel de rigor científico de las tesis de los graduandos; sin embargo, no arrostran el problema como propio.

**Palabras clave:** formación en investigación; estudios de posgrado; asesorías de tesis.

## **Abstract**

The study proposed to characterize the teaching population of the Medical Faculty with respect to its investigating experience itself and to his perception of the service of formation that they offer in investigation. Through an instrument type questionnaire, the envoy went to the institutional mail's address to teachers' total population than labor in the Medical Faculty, in application Google: Fill-out forms. They accepted answers during the month of March 2021. 165 questionnaires of 315 teachers' total with deals of Ley of salaries were responded and Permanents, where obtained him the fact that the expert with over 5 years in teaching, with not much investigating experience and with a fall is a teaching population principally values of postgrad's studies. The teachers by majority perceive the investigating competition like a subject unnecessary curricular; Nevertheless, they exercise the investigating formation in the main and, teachers' reduced number they are assigned to the expert advice of the works of grade or they are renowned like appraising tribunal for Thesis's student defenses. The teachers in general perceive problems of quality in the level of scientific rigor of the theses of the undergraduates, however, they do not brave the problem like own.

**Keywords:** research training; postgraduate studies; thesis advice.

## Introducción

La Facultad de Medicina (FM) de la Universidad de El Salvador, cuyo nacimiento data de la primera mitad del siglo XIX, con una única carrera, en la actualidad imparte once carreras de grado, tres posgrados de maestría y catorce especialidades médicas, distribuidos en tres escuelas.

Las funciones sustantivas de la universidad son la docencia, la investigación y la proyección social. En gran medida, los docentes han de ejecutar esas funciones sustantivas, aun cuando la proyección social esté a cargo de unidades administrativas específicas; de igual manera, la investigación la realizan, sobre todo, los diversos institutos de investigación unidades administrativas usualmente regidas por docentes asignados para tal fin.

Por otra parte, el proceso educativo docente/estudiantil, guiado por el currículo de cada carrera, lleva consigo la formación investigativa y la proyección social, que están imbuidos en los actos educativos. «La formación científico investigativa abre un espacio significativo al contexto académico por ser factor clave de productividad individual, institucional y de conocimientos para las universidades» (Salazar, Lugones & Acuña, 2020, p. 188). Esta tiene una ejecución obligada por estar consignada en los currículos.

Hacer investigación no resulta una actividad exclusiva del investigador experto. La investigación «puede ser utilizada como una potente herramienta de formación de recursos humanos; incluso, se ha considerado por algunos como la forma más perfecta de la enseñanza universitaria» (Ávila, Pérez & González, 2019, p. 97). Esto expone dos perspectivas de la investigación:

- La función universitaria de investigación, que realizan los docentes, mediante sus competencias investigativas individualmente, por sus propios medios o afiliados a algún instituto de investigación en la universidad.
- La labor docente de formación investigativa, ejercida con

los estudiantes en las aulas o en el trabajo de campo; lo cual no se constituye en función sustantiva de investigación de la institución.<sup>1</sup>

Los docentes tienen la responsabilidad de hacer investigación en las universidades, ya sea como función de la institución o como entes formadores en investigación de estudiantes en sus respectivas profesiones. «Lo que diferencia a la investigación formativa de la investigación en sentido estricto es la profundidad del estudio, su criterio metodológico, la conformación de líneas, programas y proyectos de investigación a partir de las líneas» (Rodríguez, 2009, p. 28).

Al revisar la literatura científica relacionada con las competencias investigativas, algunas las definen «Como un conjunto de conocimientos, habilidades, y destrezas y actitudes que deben someterse a prueba a la hora de hacer» (Ávila, Pérez & González, 2019, p. 110); asimismo, deben tenerse en cuenta al formar estudiantes en investigación científica. Otros autores plantean las competencias investigativas como habilidades investigativas que constituyen el eje transversal de la formación para la investigación en el pregrado (Rodríguez & Delgado, 2014).

Indagar sobre las competencias investigativas de los docentes de la Facultad de Medicina (FM) de la Universidad de El Salvador constituye un objetivo complejo, que escapa a las aspiraciones de este estudio. Esta investigación se limita a la experiencia investigativa profesional, laboral y actual de los docentes, así como a su percepción del servicio de formación en investigación que brindan y a uno de los resultados de este: las tesis de grado.

Sin embargo, para garantizar el éxito y la efectividad de cualquier programa de desarrollo profesional en el área de investigación, resulta fundamental promover la participación y el trabajo en equipo de todos los actores educativos, así como estimular un clima satisfactorio de visión compartida, donde la creatividad y la innovación puedan maniobrar en un ambiente de diversidad, prácticas investigativas tradicionales, posturas epistemológicas encontradas y demandas profesionales estructurales (Levison & Salguero, 2009, p. 124).

También hay que tener en cuenta que, dadas las altas exigencias que suponen las competencias investigativas en educación superior para la docencia y la proyección social, bien podría ser la investigación solo una herramienta «didáctica» en el proceso educativo; sin olvidar que la labor del profesional de la educación superior representa un proceso transdisciplinario, en el cual la integración de saberes, la responsabilidad compartida y el trabajo en equipo se necesitan para enfrentar la realidad. La investigación es el medio a través del cual se consigue el perfeccionamiento de las propias competencias.

Baldo y Rangel (2015) consideran:

La universidad como un espacio donde debe regir la función investigación por parte de los docentes que hacen vida en ella, donde varían los saberes, los métodos empleados en su búsqueda y su transmisión, y el uso que se hace de estos. (p. 28)

Los docentes tienen en sus manos aparatos de desarrollo humano en tanto que las universidades se presentan como el escenario perfecto para la producción y generación de nuevos conocimientos (Ayala & Barrera, 2018).

Ciertamente, «investigación y docencia son dos cosas distintas; por lo tanto, unir estas dos actividades implica establecer diferencias y herramientas que permitan caminar por dos senderos distintos, pero que al final tienen un punto en común» (Zúñiga, 2015, p. 20). Este punto en común supone la riqueza educativa, la posibilidad de crecimiento académico: «El perfeccionamiento de las capacidades investigativas en los docentes universitarios permite, a corto, mediano y largo plazos, resolver los problemas profesionales desde un enfoque científico e investigativo» (Barbón, Barriga, Cazorla & Cepeda, 2018, p. 81).

Como «experiencia investigativa del docente» se entenderá la cuantía de investigaciones realizadas posterior a su grado académico, de forma individual o con otros profesionales, y las investigaciones que este pudiera tener en desarrollo.



Mientras, «percepción del servicio de formación en investigación» se entenderá en dos sentidos: desde la percepción que tienen los docentes con relación a la importancia que le atribuyen a la exigencia curricular de las competencias investigativas, y acerca de su percepción sobre las tesis:

- a) de las asesorías u orientaciones que realizan a los estudiantes para el desarrollo de investigaciones (formación investigativa), y
- b) sobre la percepción que los docentes tienen con respecto a la calidad de las tesis de los estudiantes que se gradúan.

Conocer las competencias investigativas pasa por saber primero los rasgos generales básicos de los docentes. Por ello este estudio plantea como objetivo caracterizar la población docente de la Facultad de Medicina, con respecto de su experiencia investigativa y su percepción del servicio de formación en investigación como educadores.

## Métodos

Este fue un estudio cuantitativo y descriptivo. Los datos se recolectaron durante marzo de 2021, bajo las restricciones aun mantenidas por el Estado salvadoreño a causa de la pandemia de COVID-19. La población en estudio estuvo constituida por el claustro docente activo de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.

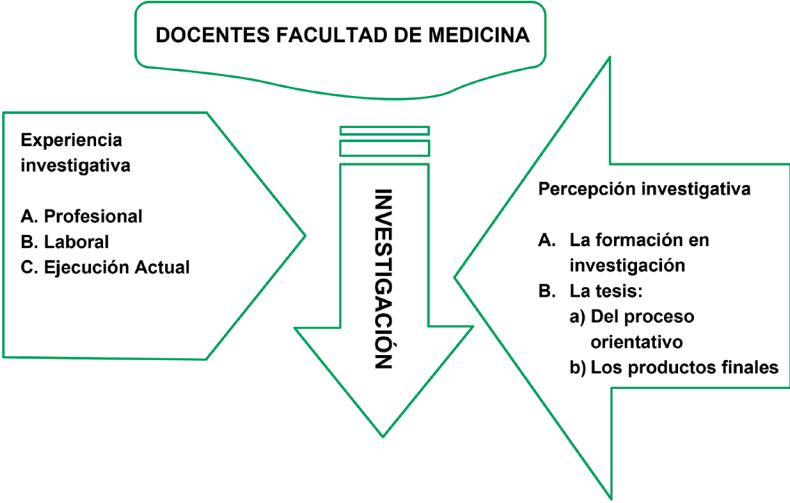
Se administró un cuestionario al universo poblacional, a través del correo electrónico institucional, y se envió el enlace de aplicaciones Google. El formulario se dejó activo durante este período para que fuera contestado, según disponibilidad y deseo de cada docente. El cuestionario se estructuró de la siguiente manera:

- Datos generales de la población.
- Experiencia investigativa de la población.
- Percepción docente sobre las asesorías investigativas y las tesis.

Para el análisis y la interpretación de los resultados se usó la estadística descriptiva y el conocimiento de convivencia prolongada compartido con la población en estudio.

La Figura 1 expone la estrategia o pretensión teórica-metodológica encaminada a alcanzar el objetivo del estudio.

**Figura 1.** Ruta teórico-metodológica del artículo



## Resultados

De un universo poblacional de 315, contestaron el cuestionario 165 docentes, pertenecientes a 15 profesiones diferentes. El mayor número correspondió a la carrera de Medicina, la cual tenía la cantidad más elevada de profesionales contratados (Tabla 1).

**Tabla 1.** *Profesión de docentes de la Facultad de Medicina participantes en el estudio*

Carrera	No docentes	%
Medicina	86	52,1
Fisioterapia y terapia ocupacional	14	8,5
Salud materno-infantil	8	4,9
Radiología e imágenes	1	0,6
Laboratorio clínico	6	3,6
Anestesiología e inhaloterapia	7	4,2
Enfermería	12	7,3
Salud ambiental	2	1,2
Educación para la salud	4	2,4
Optometría	4	2,4
Psicología	4	2,4
Sociología	1	0,6
Biología	2	1,2
Química y farmacia	3	1,8
No contesta	6	3,6
Total	165	100

Los docentes con posgrado resultaron minoría. Los docentes con posgrado académico de Doctor representaron solamente el 1,2 % de la muestra y el 57 % no poseía titulación de posgrado (Tabla 2). Por tanto, se impone repensar los procesos de formación continua para elevar el nivel académico del claustro como vía primera para promover las competencias investigativas.

**Tabla 2.** *Docentes de la Facultad de Medicina que poseían posgrado académico*

Posgrado	No	%
Doctorado	2	1,2
Maestría	29	17,6
Especialidad médica	40	24,2
Ninguno	94	57
Total	165	10

Para la caracterización se consideró oportuno precisar el tiempo dedicado en años a la labor docente por los profesionales de la Facultad de Medicina de la UES que conforman la muestra. En la Tabla 3 se puede apreciar que la mayor cifra se halló en los que acumulaban más de 20 años, los cuales, sumados a los que tenían entre 6 y 20 años, constituyeron el 77,6 % del total. Esto indicó que era un claustro con experiencia.

**Tabla 3.** *Tiempo (en años) de labor docente en la institución*

Años	No	%
0-05	37	22,4
06-10	28	16,9
11-15	17	10,3
16-20	23	14
+ de 20	60	36,4
Total	165	100

Con respecto a la realización de la investigación denominada estudio de grado o tesis (Tabla 4), el 11,5 % de los docentes refirió no haberla realizado. Posiblemente, estos correspondan al período de guerra civil donde se estableció una memoria de labores del “año social” en sustitución de una tesis a los estudiantes de medicina. Este dato se puede constatar de forma fehaciente en el tesario de la biblioteca en la década de los años ochenta. Del 88,5 % restante, alrededor del 40 %, la presentaron en grupos de más de tres personas (Tabla 5), hasta decenas de graduandos, aseveran los docentes. Fue posible constatar algunos casos en el tesario de la biblioteca de la FM en las ubicaciones 1524 (1983), 1595 (1986), 4061 (1995), 4072 (1995), etcétera. Después de 1996 ya no se encontraron tesis de más de tres personas.

**Tabla 4.** *Elaboración de tesis de los docentes para obtención de grado académico*

Elaboración y presentación de tesis	No	%
Sí	146	88,5
No	19	11,5
Total	165	100

**Tabla 5.** *Número de participantes en elaboración de tesis*

Número de participantes tesis	No	%
1 a 3 personas	88	60
+ de tres	58	40
Total	146	100

Si se toma en cuenta que una tesis de más de tres graduandos supone un esfuerzo minúsculo para la mayoría y la experiencia de aprendizaje solo queda concentrada en un par de graduandos que sacan adelante el proyecto, entonces poco menos del 46 % de la muestra de este estudio no habría realizado ningún estudio científico investigativo para la obtención de su grado académico.

## Experiencia investigativa docente

### Profesional

La Tabla 6 muestra que un tercio de la muestra (33,4 %) no ha realizado ninguna investigación individual posterior a la obtención del grado académico. Además, si se considera la co-ocurrencia entre el número de estudios llevados a cabo individualmente por los docentes y la contribución que hacen los que tienen más de veinte años de labor (Tabla 3), en el rango de 1 a 2 investigaciones realizadas es 20; aunque resulta una cifra baja, representan la mayoría, lo cual se comprende si se tienen en cuenta las décadas de trabajo como docentes, en contraposición del grupo de 0 a 5 años de labor, que contribuye muy de cerca con 17 docentes. Sin embargo, los docentes de más de 20 años que refieren no haber realizado ninguna investigación son 20 (36,4 %); por su parte, los que han laborado de 0 a 5 años son 14 (25,5 %).

**Tabla 6.** *Número de investigaciones realizadas por docentes de manera individual versus el tiempo de labor en la Facultad de Medicina*

No de investigaciones	Individuales	%	0-5 años	6-19 años	+ de 20 años
1-2	66	40	17		20
3-5	26	15,7	5		10
+ de 5	18	10,9	1		10
Ninguna	55	33,4	14		20
Total	165	100	37		60

*Nota:* \*Se disgrega del dato la contribución hecha por el grupo con 0 a 5 años laborando (22,4 % del grupo muestral) en la FM; \*\*se disgrega del dato la contribución hecha por el grupo con + de 20 años laborando (36,4 % del grupo muestral) en la FM.

La Tabla 7 evidencia los porcentajes de cooperación de los docentes para la investigación, donde a todas luces es evidente que resulta un aspecto muy afectado y que requiere de mayor atención, pues los resultados científicos más significativos a nivel internacional responden al trabajo cooperado de los científicos.

**Tabla 7.** *Número de Investigaciones realizadas en contribución por varios docentes posterior a la obtención del grado académico en la FM*

No de investigaciones	Con otros profesionales	%
1-2	85	51,5
3-5	17	10,3
+ de 5	17	10,3
Ninguna	46	27,9
Total	165	100

La Figura 2 compara las investigaciones hechas solo o con otros profesionales. Se observa que la cooperación científica y la realización de estudios científicos en colaboración con otros profesionales potencia o mejora las tasas de ejercicio de la investigación.

**Figura 2.** Comparación de investigaciones realizadas de manera individual y con otros profesionales docentes



En resumen, con respecto a la experiencia investigativa del docente después de haber conseguido su grado académico, se ha evidenciado que más de un tercio de la muestra no ha realizado ninguna investigación y que, además, la contribución que hacen los docentes con más años de labor es levemente mayor. Este aspecto deberá inquietar a la gestión académica de la Facultad. Sin embargo, resulta natural que los docentes en función de las disciplinas científicas, las vocaciones personales, pericias y voliciones en general, se decanten y especialicen o ejerzan labores de docencia, administrativas, de gestión educativa, etcétera, y no solo la investigación. Incluso, muchos deben ejercer esas funciones laborales para que otros docentes se dediquen con cierta exclusividad a la investigación.

**Laboral**

La tabla 8 muestra que el 37,6 % de los docentes refieren no haber realizado ninguna investigación en conjunto con sus estudiantes. Por otra parte, al sumar los grupos de 3-5 y más de 5 investigaciones junto con estudiantes, se alcanza el 44,8 % de la muestra. Los datos reflejan que la realización de investigaciones en conjunto entre docentes y estudiantes no constituye una práctica común desarrollada en la Facultad de Medicina.

**Tabla 8.** *Investigaciones conjuntas entre docentes y estudiantes*

Número de estudios	No	%
1-2	29	17,6
3-5	18	10,9
+ de 5	56	33,9
Ninguna	62	37,6
Total	165	100

Las Tablas 9, 10 y 11 se sintetizan en la figura 3, donde puede verse que la formación docente investigativa se practica en forma generalizada por parte de la población docente a sus estudiantes. Únicamente el 16,4 % refiere que rara vez instruye sobre procesos investigativos; por otra parte, parece que las asesorías o direcciones de tesis y las defensas de estas se realizan por un reducido grupo de docentes permanentemente. De igual manera, hay otro grupo de docentes, un tercio de la muestra, que rara vez se suma a esas labores. Lo anterior devela la necesidad de enfatizar en la cooperación entre docentes y estudiantes en las distintas actividades investigativas.

**Tabla 9.** *Acción educativa de formación investigativa en cátedra por docentes de la FM*

Ejercicio docente	No	%
Siempre	77	46,65
Algunas veces	42	25,45
Rara vez	27	16,4
Ciclo sí/ciclo no	19	11,5
Total	165	100

**Tabla 10.** *Labor docente en asesoría de tesis estudiantiles*

Ejercicio docente	Fc	%
Siempre	65	39,4
Algunas veces	36	21,8
Rara vez	56	33,9
Ciclo sí/ciclo no	8	4,8
Total	165	100



Tabla 11. Labor docente como oponente en defensas

Ejercicio docente	Fc	%
Siempre	46	27,9
Algunas veces	53	32,1
Rara vez	56	33,9
Ciclo sí/ciclo no	11	6,7
Total	165	100

Figura 3. Función laboral investigativa de los docentes de la FM



Ejecución actual de investigaciones

De las investigaciones en ejecución el dato peculiar a comentar es el 7,9 % que refiere que tal vez están en alguna investigación en curso actualmente (Tabla 12). Al indagar con respecto a esas respuestas, explican que tienen alguna investigación parcialmente ejecutada y en espera de reactivo químico o biológico; o también de la erogación de fondos sin los cuales no pueden continuar el estudio científico.

**Tabla 12.** *Docentes de la Facultad de Medicina con investigación en etapa de ejecución*

Ejercicio de ejecución	No	%
Sí	36	21,8
Tal vez	13	7,9
No	116	70,3
Total	165	100

Es de notar que solo un quinto de la población docente refiere estar realizando actualmente una investigación y alrededor del 80 % de los docentes no está investigando. El dato resulta inquietante, teniendo en cuenta que una de las ocupaciones fundamentales de las universidades y su sentido de existencia es la investigación en sus dos direcciones: formar investigadores e investigar para resolver problemas de la práctica social.

La labor docente de formación investigativa está muy diseminada. La mayoría de los docentes forma en investigación a futuros profesionales de la salud, pero también el mayor número (70,3 %) no se encuentra realizando ninguna investigación. Entonces resulta válido cuestionarse cómo es posible que alguien que no lleva a cabo una actividad, que no sistematiza una competencia investigativa, pueda contribuir a formarla. Lo anterior indica uno de los aspectos que requiere seguimiento por parte de las autoridades académicas.

## Percepción investigativa docente

### Formación investigativa curricular

La Tabla 13 evidencia que solo el 45,5 % de los docentes exponen que la competencia investigativa en las profesiones que forman tiene la condición de “insustituible”, con lo cual el resto (55,5 %) percibe que es deseable, complementaria y hasta innecesaria.

**Tabla 13.** *Opinión docente de las competencias investigativas para las profesiones que forman*

Percepción docente	No	%
Insustituible	75	45,5
Deseable	49	29,7
Complementaria	40	24,2
Innecesaria	1	0,6
Total	165	100

## Tesis

### *Proceso orientativo*

La Tabla 14 y la Figura 4 muestran que, en la percepción docente con respecto a las asesorías de tesis, alrededor de 50 expresan estar de acuerdo con la idealidad de estas; coincidentemente, similar número refiere realizar asesorías y oponencias en defensas de tesis. Los docentes que plantean que “Algunas sí/otras no” representan la mayoría de los datos. Si se suman los que dicen “No lo sé”, estos aglutinan entre el 60 % y más del 70 %.

**Tabla 14.** *Opinión docente del proceso de las asesorías de tesis que ejecutan*

Opciones	De acuerdo	Algunas sí/ otras no	Desacuerdo	No lo sé	Total
Son debidamente asesorados	41	99	8	17	165
Son oportunamente asesoradas	49	85	12	19	165
Son suficiente asesorados	37	99	8	21	165
Los documentos finales son homogéneos en cuanto a su rigor científico	50	79	20	16	165

**Figura 4.** *Percepción docente respecto del proceso orientativo de Tesis de estudiantes en la Facultad de Medicina*



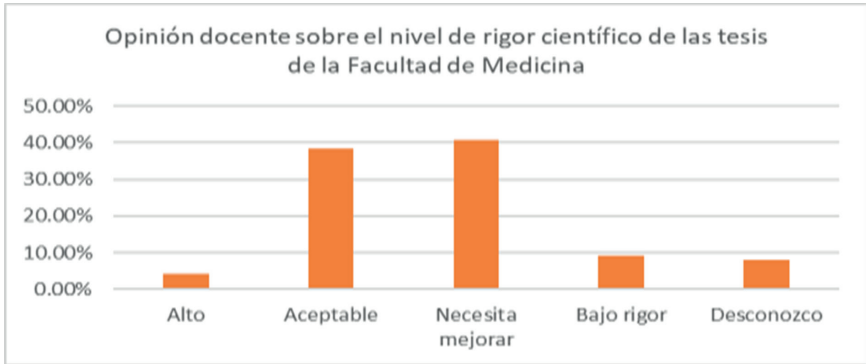
**Productos finales**

La Tabla 15 y la Figura 5 muestran que la percepción que tienen los docentes del nivel de rigor científico de las tesis comporta ritmos similares a los resultados de la tabla 14 y la figura 15. Cerca del 40 % las considera aceptables, el 50 % dice que necesitan mejorar o tienen bajo rigor científico, y el 10 % restante manifiesta alto rigor científico o aduce desconocimiento del tema

**Tabla 15.** *Percepción docente del nivel de rigor científico de las tesis que elaboran sus estudiantes en la FM*

Percepción docente	No	%
Alto	7	4,2
Aceptable	63	38,2
Necesita mejorar	67	40,6
Bajo rigor	15	9,1
Desconozco	13	7,9
Total	165	100

**Figura 5.** Opinión docente sobre el nivel de rigor científico de las tesis de la Facultad de Medicina



Es importante tener en cuenta a las percepciones, en tanto solo son representaciones internas con respecto a lo que ocurre por fuera y tienen por función interpretar para establecer una idea de un objeto, situación o contexto. Las percepciones que aquí se plantean pertenecen al cuerpo docente de la Facultad de Medicina y, en consecuencia, cobran altísima importancia en los procesos educativos de los estudiantes.

## Discusión

Este estudio da cuenta de 165 docentes de la Facultad de Medicina en el mes de marzo de 2021. Constituyen un grupo multidisciplinar, en su mayoría con más de 5 años de ejercicio docente, muy poca práctica investigativa en su formación profesional y, en su mayoría, con el rol de formación en investigación. Esto describe un círculo vicioso que hay que romper: profesionales con bajas competencias investigativas que forman en investigación a futuros profesionales.

La experiencia investigativa docente, tomando en cuenta que son profesionales con muchos años laborando como educadores, evidencia muy pocas investigaciones realizadas, con una leve mejora del indicador cuando realizan estudios en cooperación con otros profesionales. La investigación en cooperación puede ser, entre otras,

una estrategia eficiente que contribuya a la cualificación investigativa del claustro docente en la Facultad de Medicina.

En general, la actividad investigativa de los docentes de la Facultad de Medicina resulta exigua. También el ejercicio investigativo entre el docente y sus estudiantes en conjunto (37,6 %). Al mismo tenor se encuentran los docentes de una facultad ecuatoriana que plantean: «Las habilidades investigativas de los docentes de la Facultad de Biofarmacia de la UCACUE muestran debilidades con un bajo impacto sobre la comunidad y la solución de problemas científicos» (Román, Hernández, Campoverde, Baculima & Tamayo, 2017, p. 37).

En otra línea plantea Reyes (1995): «Los alumnos encuentran a la experiencia de trabajar en un proyecto de vinculación docencia investigación, como una experiencia significativa para su formación» (p. 30). Esto constituye un argumento incontestable para la implementación de esta práctica en la formación de profesionales en la Facultad de Medicina de la UES.

También, al comparar estos resultados de la actividad investigativa de docentes con un estudio realizado en Perú: «En nuestro medio el 43,8 % de los docentes universitarios de investigación científica de las escuelas de medicina, nunca ha publicado un artículo en una revista» (Quiroz, Chávarry & León, 2014, p. 58), se muestra una diferencia sustantiva puesto que esos datos en el Perú se refieren solo a los docentes que enseñan investigación y con publicaciones en revistas científicas. El dato encontrado aquí es menor y se refiere a todos los docentes, lo cual demuestra una situación desventajosa en la Facultad de Medicina salvadoreña. Por tanto, estos datos requieren ser cambiados, mejorados superados.

En la planificación curricular de las distintas carreras que se imparten en la Facultad de Medicina, la formación investigativa está consignada como necesaria, con algunas excepciones como en los currículos de Especialidades Médicas. No obstante, la formación investigativa resulta obligación en educación superior.

De similar forma, en un estudio publicado en una revista ecuatoriana se plantea: «los estudiantes y en muchos casos los docentes, relacionaban la investigación únicamente con el trabajo de grado o de titulación, mismos que en muchos casos tienden a carecer del rigor científico, al menos básico, en sus componentes teóricos y metodológicos» (Vinces, De la Peña & Obando, 2019, p. 162).

La percepción docente sobre las asesorías de las tesis parece mostrar el desconocimiento por parte de la mayoría, en tanto que principalmente refieren que unas asesorías se realizan adecuadamente y otras no, o dicen desconocer sobre el tema, lo cual es comprensible puesto que ya han adelantado no participar en asesorías de tesis ni oponencias en defensas.

La mayoría de la muestra de docente piensa que la formación de competencias investigativas para las profesiones que contribuyen a formar es deseable, complementaria, hasta innecesaria y no alcanza la condición de «insustituible». Esto se contrapone a lo expuesto por Freire, Ríos & Cuenca (2016), Rojas y Aguirre (2015) y Becerra (2012), quienes plantean la necesidad de las competencias investigativas de los profesionales en formación.

En la labor en formación investigativa están divididas las tareas: una población docente mayoritaria dedicada a la formación investigativa intermedia en las cátedras impartidas (revisiones bibliográficas, planificación de investigaciones, ensayos o estudios científicos completos de materias o módulos intermedios de formación); y otra población docente minoritaria encargada de la asesoría de tesis y la participación como oponentes de las defensas estudiantiles de estas, sin cooperación durante el proceso investigativo, sino hasta el final. Involucrar ambos grupos de docentes en las actividades del otro, puede redundar en mejoras que contribuyan a la cualificación de las competencias investigativas del claustro docente.

Los docentes de la Facultad de Medicina, en su gran mayoría, no realizan investigaciones. Solo una pequeña población entre los

docentes dedica parte de su tiempo a realizar investigación científica. No existe ningún estímulo formal administrativo o de otro tipo que promueva el ejercicio investigativo docente. El reconocimiento profesional docente por parte de la administración educativa institucional podría resultar un incentivo para esa actividad, así como la exigencia por el cumplimiento de una función que es sustantiva en términos de laboralidad.

La percepción docente de la idoneidad del proceso de asesorías para trabajos de grado y del nivel de rigor científico de los informes finales de estas planteó un problema metodológico investigativo, puesto que verter opinión al respecto supone opinar de docentes consabidos por todos, puesto que cada carrera tiene a su cargo, casi exclusivamente, esas tareas laborales asignadas.

El rasgo anteriormente señalado quizás explique los resultados, donde la mayoría de docentes plantean que, en el proceso de realización de las asesorías de tesis, unas sí son bien ejecutadas y otras no, como en actitud reticente a contestar. Existe más consistencia en los docentes con respecto a percibir algún problema en el nivel de rigor científico de las tesis, en el mismo sentido que lo señalara en un estudio (Mazariego, 2020)<sup>2</sup> referido a las tesis de 2017, donde evidenció un bajo nivel de rigor científico en estas en las once carreras de grado de la Facultad de Medicina de la UES.

## **Conclusiones**

La mayoría de docentes de la Facultad de Medicina le confieren menor importancia de la que deben tener las competencias investigativas a formar en los estudiantes de las profesiones en las que imparten docencia. Esto plantea un problema educativo. Es necesario el convencimiento docente acerca de la importancia de las competencias investigativas para la formación de nuevos profesionales. Para superar este problema educativo hay que tomar medidas encaminadas a cimentar la importancia de las competencias investigativas.



Los docentes conocen insuficientemente la eficacia de las asesorías, solo los encargados de su realización hacen lo que les parece adecuado y así sin más se llevan a cabo las promociones estudiantiles. No están normadas con detalle las maneras o el proceso para realizar las asesorías, sino únicamente los tiempos administrativo académicos del proceso, según lo manifestaron coordinadores de seminario. Para trascender este problema se requiere incorporar al claustro docente a las actividades de asesorías, donde participando o viendo participar a otros docentes se lograrán, eventualmente, asesorías con cooperación científica que impacten positivamente en la calidad de los estudios científicos de los profesionales en formación.

Finalmente, los docentes en general perciben problemas de calidad en las tesis de los graduandos; sin embargo, no arrostran como propio el problema. Esta actitud descrita solo podrá ser superada en la medida en que al docente se le exijan las competencias investigativas como forma de cualificar su labor docente.

## **Referencias bibliográficas**

1. Ávila, E. F., Pérez, J. C. & González, F. C. (2019). Construcción social de las competencias investigativas de los docentes de educación superior. *REFCale*, 7 (2), 91-110. <http://refcale.uleam.edu.ec/index.php/refcale/article/view/3006>
2. Ayala, E. T. & Barrera, J. M. (2018). Competencias investigativas en docentes universitarios. El caso del departamento de arquitectura de la Universidad Francisco de Paula Santander. *Revista Perspectivas*, 3 (1), 71-84. DOI: <https://doi.org/10.22463/25909215.1425>
3. Baldo, J. & Rangel, Z. (2015). Medición de las competencias investigativas en los docentes adscritos al departamento de ciencias sociales de la Universidad Nacional Experimental del Táchira. *Aibi Revista de Investigación, Administración e Ingeniería*, 3 (2), 27-36. DOI: <https://doi.org/10.15649/2346030X.513>

4. Barbón, O. G., Barriga, S. F., Cazorla, A. L. & Cepeda, L. G. (2018). Influencia de la Antigüedad y del total de Horas de Investigación en la Producción Científica de Docentes Universitarios. *Revista Formación Universitaria*, 11 (4), 75-82. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-50062018000400075>
5. Becerra, G. M. (2012). La formación investigativa: Su pertinencia en pregrado. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte*, 1 (35), 367-79. <https://revistavirtual.ucn.edu.co/index.php/RevistaUCN/article/view/366>
6. Freire, E. E., Ríos, A. R., & Cuenca, N. P. (2016). Formación de competencias investigativas en los estudiantes universitarios. *Revista Atenas*, 1 (33), 18-31. <http://atenas.umcc.cu/index.php/atenas/article/view/183>
7. Levison, Y. C. & Salguero, L. A. (2009). Una propuesta de competencias investigativas para los docentes universitario. *Laurus Revista de Educación*, 15 (30), 118-37. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=76120651006>
8. Quiroz, R., Chávarry, P. & León, F. (2014). Baja producción científica estudiantil y de docentes universitarios de investigación científica: Un problema persistente. *Revista del Cuerpo Médico del HNAAA*, 7 (4), 58.
9. Reyes, L. M. V. (1995). Una experiencia de participación estudiantil en investigación. *CIENCIA ergo-sum*, 2 (1), 27-31. <https://cienciaergosum.uaemex.mx/article/view/8068>
10. Rodríguez, D. M. & Delgado, D. L. (2014). Las habilidades investigativas como eje transversal de la formación para la investigación. *Revista Tendencias pedagógicas*, 24, 347-60. <https://revistas.uam.es/tendenciaspedagogicas/article/view/2110>
11. Rodríguez Y. J. (2009). La formación de docentes investigadores: Lineamientos pedagógicos para su inserción en los currícu-

los. Teoría y praxis investigativa, 4 (1), 25-32. <https://hdl.handle.net/10901/10009>

12. Rojas, C. & Aguirre, S. (2015). La formación investigativa en la educación superior en América latina y el Caribe: Una aproximación a su estado del arte. *Eleuthera*, 12, 197-222. DOI: <https://doi.org/10.17151/eleu.2015.12.11>
13. Román, C., Hernández, Y., Campoverde, D., Baculima, J. & Tamayo, T. (2017). Habilidades científico investigativas de docentes de la Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. *Panorama Cuba y salud*, 12 (1), 32-9.
14. Salazar, S., Lugones, Á. C. & Acuña, J. E. (2020). Formación científico investigativa en estudiantes universitarios del perfil ingeniería mecánica en Venezuela. *Didasc@lia: Didáctica y Educación*, 11 (5), 187-99. <http://revistas.ult.edu.cu/index.php/didascalía/issue/view/57>
15. Vines, M. R., De la Peña, G. & Obando, L. M. (2019). La formación investigativa de los estudiantes de la carrera de optometría de la facultad de ciencias de la salud, Universidad Técnica de Manabí. *Polo del Conocimiento*, 4 (5), 157-75. DOI: <https://doi.org/10.23857/pc.v4i5.970>
16. Zúñiga, W. (2015). Una perspectiva acerca de la investigación y la docencia universitaria en Colombia. En *Clave Social*, 4 (1), 10-23. <https://www.researchgate.net/publication/349147265>

## **Notas complementarias**

1. Reglamento General de la Ley de Educación Superior. Art. 23. No se entenderá como investigación institucional las actividades o proyectos realizados por los estudiantes.
2. Mazariego, E. (2020, octubre 29). Nivel del rigor científico en tesis de 2017 en la Facultad de Medicina, Universidad de El Sal-

vador. V Congreso Internacional de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### **Contribución de los autores**

Edwin Mazariego Flores: Búsqueda bibliográfica, sistematización y análisis de la información, y redacción del manuscrito.

Maikel Carnero Sánchez: Búsqueda bibliográfica y revisión.

# La cooperación científica para la asesoría de tesis de posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-LEÓN

Edwin Mazariego López

edwin.mazariego@ues.edu.sv

Universidad de El Salvador

Orcid: 0000-0003-1396-6026

Fecha de recepción: 20 de enero de 2021

Fecha de aprobación: 25 de marzo de 2021

<https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2311/2307>

## Resumen

En el contexto de la realización de una pasantía doctoral realizada en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua sede León, este estudio se planteó por objetivo determinar el significado que dan los docentes a la cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de los tesis de posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas de la mencionada universidad. Con ello se podrá también tener indicios de la medida en que se ejerce la cooperación científica para la orientación tutorial en este centro de estudios. Se eligieron tres centros de investigación con programas de posgrado donde se realiza formación de diversas maestrías y doctorados. Esta elección fue producto de la gestión realizada por parte de las docentes de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León asignadas como tutoras del pasante. Los centros de investigación aludidos son: 1) de Investigación en Salud Trabajo y Ambiente; 2) de Investigación en Demografía y Salud y 3) de Investigación de Enfermedades Infecciosas. El enfoque metodológico de la investigación realizada fue fenomenológico hermenéutico, a través del cual se pudo llegar, desde la experiencia docente, al significado de cooperación científica para la orientación tutorial de las tesis de posgrado, misma que, desde sus propias vivencias los asesores la perciben como un proceso donde la idea inicial del estudio de tesis sea del asesor, del tesis o del claus-

tro (de todos), es adoptada por el asesor y la admite como responsabilidad propia. El tesista, por su parte, asume y recibe del asesor indicaciones de las operaciones a realizar y la motivación para alcanzar su cometido, el tesista deberá mostrar con vehemencia e interés académico a fin de mantener ulteriores apoyos por parte del asesor hasta la defensa de las tesis y tangencialmente de otros profesores del claustro. Finalmente los asesores subsumen, en tanto que tutores, el logro del tesista como propio.

**Palabras clave:** tutoría de tesis, cooperación científica, orientación tutorial, posgrado

## Abstract

In the context of a doctoral internship carried out at the National Autonomous University of Nicaragua, León, this study had as its objective: to determine the meaning that teachers give to scientific cooperation for the tutorial orientation of the thesis students' research. postgraduate in the Faculty of Medical Sciences of the aforementioned university, with this it will also be possible to have indications of the extent to which scientific cooperation is exercised for tutorial orientation in this study center. Three research centers with postgraduate programs where training of various master's degrees and doctorates are carried out were chosen. This choice was the product of the management carried out by the teachers of the Faculty of Medical Sciences UNAN-León assigned as tutors of the intern. The aforementioned research centers are: 1. Research in Occupational Health and the Environment; 2. Research on Demography and Health, and 3. Research on Infectious Diseases. The methodological approach of the research carried out was hermeneutic phenomenological, through which it was possible to arrive, from the teaching experience, at the meaning of scientific cooperation for the tutorial orientation of the postgraduate theses, which, from their own experiences, the advisors perceive it. as a process where: The initial idea of the thesis study is from the advisor, the thesis student or the faculty (of all), is adopted by the advisor and admits it as his own responsibility. The thesis student, on the other hand, assumes and receives from the advisor indications of

the operations to be carried out and the motivation to achieve his mission, the thesis student must show vehemently, academic interest in order to maintain further support from the advisor until the defense of the thesis and tangentially from other professors of the faculty, finally the advisors subsume, as tutors, the thesis student's achievement as their own.

**Keywords:** thesis tutoring, scientific cooperation, tutorial guidance, postgraduate

## Desarrollo

### A. Fundamentos teóricos

El quehacer investigativo en las universidades depende sobremedida de los docentes, puesto que son quienes determinan esa labor. Pérez, Medina & Rodríguez (2016) acotan que debido a la importancia que embiste la investigación en el ámbito social, es necesario formar estrategias para el adecuado desarrollo de las competencias investigativas con miras a producir jóvenes investigadores con calidad. Además alegan, que no basta con introducir cursos de investigación para trascender el problema, lo que suele inmediatamente pensarse para solucionar este tipo de dificultades.

No se debe olvidar que, «una de las obligaciones del profesor universitario es la disponibilidad para dirigir tesis; trabajo que ni es remunerado ni muy reconocido» (Senra Valera & Senra Valera, 2008, p. 13). En consecuencia, podría ser realizado a desgano y así contribuir a la desatención o al menoscabo de las investigaciones.

Los fundamentos educativos adoptados para la formación de posgrado tratados en este estudio están dirigidos a la formación final del proceso del posgrado al momento en el que los estudiantes están enfocados en superar la tesis que los promueva a la obtención de un nuevo nivel académico. Durante este proceso, deben en cuenta el medio social y cultural en que se desarrolla, de tal manera que

se logre formar individuos capaces de impactar positivamente en la sociedad a través de competentes y oportunos aportes científicos.

Los claustros docentes de las Escuelas de posgrado regularmente están conformados por profesionales con formaciones diversas; la formación de posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas no es la excepción.

La introducción de la interdisciplinariedad implica una transformación profunda en los métodos de enseñanza y requiere de un cambio de actitud y de las relaciones entre los docentes y entre estos y los estudiantes. Se requiere de un profesor que tenga pensamiento interdisciplinar como premisa para que pueda transmitir esta forma de pensar y proceder a sus alumnos. (Perera, 2000, p. 65)

La cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de los estudiantes de posgrado, sustentada en una concepción desarrolladora del proceso de enseñanza-aprendizaje, debe promover que todos los actos formativos sean: «productivos, participativos, promotores del desarrollo de estrategias de enseñanza-aprendizaje y de la interdisciplinariedad, creativos, portadores de la integración de lo instructivo-educativo y lo afectivo-cognitivo, condicionadores de motivaciones intrínsecas, y de la comunicación interpersonal, entre otros aspectos significativos y desarrolladores» (Fernández et al., 2007, p. 67).

Del principio vigotskyano de cooperación, argumenta Carnero, M. et.al. (2019) que:

Para estudiar, comprender e intervenir en la subjetividad humana es imprescindible contar con la participación, disposición, implicación y compromiso de todos. Se deviene en subjetividad en la relación de cooperación con los otros, por tanto, en la unidad de lo individual y lo colectivo está la posibilidad objetiva de su transformación. (p. 27)



## B. Referentes conceptuales

En este caso, la cooperación es el resultado de una estrategia de trabajo conjunto que se vale de una serie de métodos para facilitar la consecución de un objetivo: mejorar las competencias investigativas de los estudiantes de posgrado. En consecuencia, la mejora cualitativa de las tesis que realizan la cooperación es fundamental para la vida en sociedad, debido a que es una manera mejor y más eficiente de gestionar los asuntos en función del interés colectivo.

Colaboración, coordinación y cooperación son conceptos que entrañan en sí mismos el trabajo de grupo y que para el caso de las tutorías bien podría referirse a la unidad tutor-estudiante para la realización de un estudio científico de tesis. La visión científica se limita a lo que puede aportar el experto o tutor y el novel estudiante de posgrado. Es fundamental entonces someter las investigaciones y sus procesos al criterio de otros expertos y demás estudiantes con el fin de alcanzar aprendizajes desarrolladores y trabajos científicos de tesis con mejoras sustantivas en términos cualitativos.

Los referentes de la cooperación científica son abundantes. Diversos estudios científicos han adoptado la cooperación científica como estrategia de mejora para el aprendizaje, comportando ciertos matices que hacen diferencias, por ejemplo, Martínez, M., Yus, M., & Currás (2013) en un estudio sobre mejorar los aprendizajes estudiantiles en el proceso de formación universitaria plantea lo que denomina cooperación docente y argumenta que la relación cooperativa y la coordinación «producen un beneficio de aprendizaje en los sujetos participantes, estudiantes y docentes, y también proporciona un espacio de desarrollo personal-profesional y organizativo, al tratarse de un tipo de actividad producida de forma colectiva o cooperativa» (p. 457). Sin embargo, le confiere al estudiante un papel de beneficiario, con poco protagonismo cooperativo.

La propuesta de cooperación en educación de Escorcía & Gutiérrez (2009), es bastante abstracto al plantear el ejercicio de la misma, aunque exhaustivo en el abordaje de la cooperación en educación,

al tomar la cooperación a nivel administrativo, docente, estudiantil, familiar y social. También ha sido utilizada la cooperación científica conducente a mejorar la formación de los estudiantes, vinculando la comunidad, la familia y la institución educativa ( Meneses, A., Carnero , M. & Arzuaga, M., 2016).

La cooperación en la formación de Licenciados en Lengua Española para no Hispanohablantes (Xin & Carnero, 2021) constituye otro referente que valida la cooperación científica como una estrategia efectiva para alcanzar objetivos educativos. La cooperación desde la perspectiva de Villa & Yániz (1999) es una estrategia para los claustros docentes con miras a las mejoras cualitativas del ejercicio profesional, donde la cooperación debe ser adoptada como cultura.

También, la cooperación científica es referida a las co-tutorías de tesis, Recio, J., Pestaña, M. & López, M.(2012)sino en todas aquellas que cuentan con alguna tesis doctoral sobre el tema y cuyo director figura de forma expresa. Para ello, se ha trabajado con una producción total de 260 tesis doctorales durante un período que abarca desde la creación de la Licenciatura de Publicidad en la universidad española en 1971 hasta el año 2010. Para los diferentes análisis se han aplicado técnicas bibliométricas. En el análisis se prestó atención a la evolución de la producción anual de las tesis doctorales, la distribución de la producción en las universidades, y en las facultades y departamentos responsables de las tesis doctorales. Finalmente, se analizó la producción de los directores de las tesis; así como los niveles de colaboración o cooperación en la dirección. El número de directores asciende a doscientos catorce. Las tesis dirigidas por más de un director se elevan a 25.”container-title”:”Revista española de Documentación Científica”,”DOI”:”10.3989/redc.2012.3.890”,”ISSN”:”1988-4621”,”issue”:”3”,”language”:”es”,”note”:”number: 3”,”page”:”433-452”,”source”:”redc.revistas.csic.es”,”title”:”Producción y dirección de tesis doctorales sobre publicidad en la universidad española (1971-2010 significan el concepto, limitándolo a las asesorías de tesis, pero referido a la asignación de codirectores de tesis. La misma idea plantea Esparcia (2011) con investigadores experimentados, la cooperación entre pares, inclusive de diferentes disciplinas.

Por otra parte, respecto al referente teórico de tutor, Anglat (2011) concibe que en condiciones óptimas, un orientador o tutor de tesis tiene por funciones generales realizar con el maestrando la evaluación temprana y realista de las necesidades del estudiante, desafío académico y valoración, gestión del conocimiento, reuniones frecuentes, revisión del trabajo escrito, retroalimentaciones inmediatas y constructivas, advertencia de las señales de peligro, promoción del acceso a la cultura de la investigación y aculturación en una comunidad de práctica. Sin embargo, aún alcanzadas satisfactoriamente las funciones que propone Anglat, no se logra plasmar en los documentos contruidos más perspectiva que la del tutor y marginalmente la visión de los tesisas.

Una acepción general de tutoría de Álvarez (2013) la plantea como una tarea integrada en la labor docente, que implica una interacción personalizada del profesor tutor con el alumnado. Empero, al limitarse a la perspectiva que posee el tutor del proceso enseñanza-aprendizaje, adolece, por otra parte, de la riqueza que supone el aprendizaje grupal. No se puede soslayar que para el trabajo académico formativo en educación superior, múltiples estudios han demostrado que el aprendizaje mejora en términos cualitativos y cuantitativos cuando es realizado en grupos cooperativos «[...] la interrelación entre los alumnos, entre alumnado y profesorado y entre profesores aumenta considerablemente el desarrollo del aprendizaje» (Grané Teruel et al., 2011, pp. 2337-2348) de similar forma lo plantea Fuentes (2012).

Diversas teorías muestran que el aprendizaje se potencia cuando se construye en grupo (Navarro & Guerra, 2014; Roman et al., 2017; Slavin, 2014). La cooperación aplicada desde diversas perspectivas en el ámbito educativo ha tenido éxito para mejorar los procesos pedagógicos. Los docentes deben planificar y mejorar el desarrollo de los aprendizajes que el estudiante realiza a lo largo del proyecto de formación en la universidad. En consecuencia, los docentes coordinadamente deben «realizar esfuerzos compartidos y coordinados, toma de decisiones para establecer prioridades y adaptación a las exigencias del proceso de aprendizaje en tareas auténticas, organiza-

das según un conocimiento integrado y no fragmentado del saber» (Santamaría, 2011, p. 44), y la orientación tutorial para la realización de las investigaciones o tesis no son la excepción en el referido proceso de aprendizaje, por lo contrario, quizá ahí es donde se necesiten mayores esfuerzos.

Finalmente, tomando en consideración todos los aspectos disertados sobre las obras y autores consultados que han conseguido sistematizar y fundamentar con acierto, desde sus perspectivas, la cooperación científica, no se ha encontrado una definición concreta para el objeto de esta investigación, que pueda dar respuesta a la pregunta científica: ¿cómo significan los docentes la cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de los tesisistas de posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, sede León?

En función de precisar el concepto, de operativizarlo, se entenderá aquí, la cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de posgrado como la colaboración en la toma de decisiones, responsabilidad compartida y la realización armónica de las tareas por parte del claustro (tutores, profesores, directivos y estudiantes) en función de la orientación tutorial respecto de los niveles de ayuda que van desde indicar las acciones a realizar, precisarlas con profundidad y poner ejemplos de cómo hacerlo, durante las fases de planificación, ejecución y socialización de las investigaciones.

En consecuencia, de la definición anterior se desprenden las siguientes dimensiones y sus indicadores:

1. Cooperación del claustro: colaboración en la toma de decisiones, responsabilidad compartida y realización armónica de las tareas durante el proceso de asesorías para la realización de las investigaciones hasta su culminación.
2. Orientación tutorial: establecer niveles de ayuda al indicar las operaciones investigativas a realizar, precisar con profundidad las mismas y/o poner ejemplos de cómo desarro-

llarlas durante el proceso de asesorías para la realización de las investigaciones hasta su culminación.

Este estudio tiene por objetivo describir el significado de la cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de los tesisistas de posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Autónoma de Nicaragua sede León, desde las dimensiones éticas de la experiencia cotidiana.

Es importante precisar que por los inconvenientes temporales que ofreció el periodo de pasantía, la cooperación científica se indagó principalmente desde la perspectiva docente en la dimensión «cooperación del claustro» y solo brevemente en la dimensión orientación tutorial, donde además se logró evidenciar en algunos casos, la perspectiva del estudiante de posgrado.

## **Metodología**

El Tipo de estudio fue descriptivo desde una perspectiva cualitativa.

Las experiencias, recopiladas por la fenomenología hermenéutica y luego plasmadas en descripciones, serán eficaces para analizar los aspectos pedagógicos en la cual el educador debe interesarse a profundidad por los acontecimientos que ocurren en el aula y optimizar la práctica pedagógica (Fuster G., 2019).

Siguiendo a Fuster (2019) el análisis e interpretación de los datos los plantea en cuatro fases. Laprimera fase: etapa previa o clarificación de presupuestos. Segunda fase: recoger la experiencia vivida. Tercera fase: reflexionar acerca de la experiencia vivida-etapa estructural. Donde hay una determinación del tema central que domina cada unidad temática y una cuarta fase: escribir-reflexionar acerca de la experiencia vivida. Donde se da la integración de todas las estructuras particulares en una estructura general.

Población: los informantes clave de cada centro de investigación, gestionados por las tutoras asignadas al pasante, fueron 11 docentes, ocho tutores o asesores del CISTA, dos del CIDS y uno del CEI. Por otra parte, se presenciaron una defensa de tesis y cuatro asesorías de investigaciones de tesis en proceso. Los informantes fueron:

3. Las tutoras asignadas al pasante, las que explicaron las condiciones y requerimientos del entrevistador visitante, solicitaron la libre colaboración o participación de los docentes asesores y estos, a sus estudiantes en los casos de la observación no participante para las asesorías y defensa de tesis.
4. Entrevistados a través de una guía de entrevistas semiestructurada diseñada para indagar sobre las maneras en que son plinificadas, ejecutadas y evaluadas las tesis de los posgraduados que atienden, con lo cual se evidenció la cooperación del claustro ejercida durante el proceso y marginalmente la orientación tutorial.
5. Observados, con el cumplimiento de una guía de observación no participante que diera cuenta de los procedimientos que se realizan durante dos momentos: asesorías de tesis y defensas de tesis, con lo cual se evidenció la orientación tutorial ejercida durante el proceso y marginalmente la cooperación del claustro.

Estrategia metodológica: un enfoque fenomenológico hermenéutico, partiendo de un concepto predeterminado (cooperación científica) que comprende dos dimensiones categoriales: cooperación del claustro y orientación tutorial, con tres indicadores cada una (1. Colaboración en la toma de decisiones, 2. Responsabilidad compartida, 3. Realización armónica y; 1. Se indican las operaciones a realizar. 2. Se precisan con profundidad, 3. Se ejemplifican, Respectivamente.) apoyado con el uso del programa para análisis cualitativo Atlas. ti 8.0.

## Resultados

Antes de exponer los resultados del objeto de este estudio: la cooperación científica, se exponen las siguientes ideas relacionadas que, si bien no son parte del objetivo planteado para esta investigación, devinieron en hallazgos importantes que pueden ayudar a comprender la cooperación científica realizada con los estudiantes del posgrado en la Facultad de Ciencias de la Salud. Por otra parte, se da cumplimiento a la primera fase del análisis fenomenológico hermenéutico.

Las horas laborales ejercidas en los procesos formativos de los posgrados no son reconocidas por la institución como carga laboral de los docentes. Es un descontento universalmente expresado por los entrevistados. Más allá de los beneficios que resultaran del trabajo docente en el posgrado, se puede inferir que es un potencial desmotivante de la labor en los posgrados. Por otra parte, ante el acúmulo de maestrandos egresados sin graduarse, se tomaron medidas como explicar a los estudiantes en abandono las conveniencias que suponía concluir la tesis y con ello la formación con lo que han conseguido superar este problema educativo.

La muestra del claustro respecto de los institutos de investigación a los cuales se tuvo acceso es poco homogénea, es decir, los informantes de un centro superan en número a los informantes de otros centros. Por lo cual, no es posible establecer comparaciones entre centros de investigación. Únicamente será posible caracterizar la cooperación científica para la orientación tutorial de los posgrados en los centros de investigación, en general, de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Se exponen a continuación los rasgos más destacados de lo que corresponde a la segunda fase del análisis: recoger la experiencia vivida respecto del tema de interés estudiado. (Ver tabla 1 y 4). También, a través del programa Atlas.ti se consiguió plasmar las co-ocurrencias entre los indicadores de cada dimensión. (Ver tablas 2 y 3).

Además, hay que tener en cuenta que la opinión del asesorado, solo ha sido evidenciada a través de las observaciones no participantes realizadas. Lo que lleva a tener las posiciones discursivas de los asesores como preeminentes, dejando así por fuera la perspectiva de vivencia del asesorado.

**Tabla 1.** *Entrevistas. Ocurrencia de indicadores de cooperación científica*

Cooperación científica	Frecuencia ocurrencia	Ejemplo del indicador
Código		
Cooperación del claustro		
Colaboración en toma de decisiones	31	Hay un tribunal que nos mandan a nosotros los protocolos unos cinco días antes para que lo leamos y en el momento... hacer las observaciones de mejora al protocolo, si va a ser factible o viable para que mejore el documento... después con su tutor.
Realización armónica	29	Más que un profesor estricto, también «tenés» que ser como un amigo que le está ayudando a conducir, no solo limitándose a la parte académica, sino que; como persona, conducirlo, guiarlo de una manera íntegra.
Responsabilidad compartida	34	El éxito de tu estudiante es tu éxito. Hay que graduar a los alumnos.
Orientación tutorial		
Se ejemplifican	2	...allí con él, y buscar información también es enseñarle al maestrante a buscar, en el momento que estamos trabajando.
Se indican operaciones a realizar	19	La cosa es decirle al estudiante esto no está bien, cambiémoslo por tal cosa y hacerlo.
Se precisan con profundidad	10	Ayer me dijiste que ibas a montar tantas pruebas... ¿Cuál es el resultado? ¿Todo está bien? ¿Hay algún problema, alguna duda? ¿Hay algo que no salió bien?
Códigos emergentes		
Antónimo de realización armónica	3	Si ellos quieren seguir formándose ya en el doctorado, si no alcanzan esa habilidad no podrán seguir formándose.
Antónimo de responsabilidad compartida	5	En este caso el tutor es el que decide cuándo, sin revisión de nadie.



**Tabla 2.** *Co-ocurrencias interna de la cooperación del claustro*

<b>n. 85</b>	<b>Colaboración en toma de decisiones 34.1 %</b>	<b>Realización armónica 30.5 %</b>	<b>Responsabilidad compartida 35.4 %</b>
Colaboración en toma de decisiones Gr=31	0	11	15
Realización armónica Gr=29	11	0	13
Responsabilidad compartida Gr=34	15	13	0

**Tabla 3.** *Co-ocurrencia interna de indicadores de orientacion tutorial*

<b>n. 29</b>	<b>Se ejemplifican 6.9 %</b>	<b>Se indican operaciones a realizar 62 %</b>	<b>Se precisan con profundidad 31.1 %</b>
Se ejemplifican Gr=2	0	1	1
Se indican operaciones a realizar Gr=18	1	0	8
Se precisan con profundidad Gr=9	1	8	0

Se ejecutó la guía de oservación durante cuatro asesorias de tesis (2 de maestría y 2 de doctorado) y una defensa de tesis de maestria. (Ver tabla 4).

**Tabla 4.** *Observación no participante. Ocurrencia de indicadores de cooperación científica*

<b>Indicadores</b>	<b>Parámetro. Frecuencia (Fc.)</b>				
	<b>No Fc.</b>	<b>Poco Fc.</b>	<b>Median Fc.</b>	<b>Fc.</b>	<b>Muy Fc.</b>
1.1. Colaboración en la toma de decisiones	1	1	1	2	
1.2. Responsabilidad compartida					
1.3. Realización armónica de las tareas		1	3	1	
2.1. Se indican las operaciones a realizar			2		3
2.2. Se precisan con profundidad las operaciones a realizar		1		2	2
2.3. Se ponen ejemplos de las operaciones a realizar		2			3

La tercera fase de analisis del proceso fenomenológico hermenéutico plantea reflexionar acerca de la experiencia vivida, donde hay una determinación del tema central que domina cada unidad temática. En consecuencia, tomando en cuenta los discursos expresados durante las entrevistas y lo observado durante las asesorías y defensa de tesis, siguiendo la fenomenología hermenéutica los sucesos sociales cursan con temas centrales que se expresan en la tabla 5:

**Tabla 5.** *Tema central por indicador*

Cooperación científica	Tema central
Código	
Cooperación del claustro	
Colaboración en toma de decisiones	Se refiere a la decisión que al final se toma es producto de lo que el asesor propone con las breves modificaciones que pudieran surgir del asesorado, sin por ello dejar de tomar en cuenta a otros expertos o comentarios surgidos del claustro en reuniones plenarias.
Realización armónica	Desde la perspectiva docente viene a ser la buena realizacion de las actividades encomendadas al tesista con la aceptacion de los mismos. Desde la perspeciva del tesista viene a ser esforzarse por la buena realizacion de las actividades que le encomendan «so pena» de «no dar la talla».
Responsabilidad compartida	A manera de aforismo dirigido al tesista: «Si demuestras interes, yo te apoyo».
Orientación tutorial	
Se ejemplifican	El tema central tácito: «La expresion más noble de enseñanza».
Se indican operaciones a realizar	Detallar las actividades a realizar es poner la responsabilidad del éxito o fracaso en el tesista. el tema central del asesor es: «ya hice mi parte...»
Se precisan con profundidad	Precisar con profundidad las actividades a realizar, cumple dos funciones: Motivar al tesista en su cometido. Compartir en parte el éxito de la tesis.

**Discusión**

Partiendo de un concepto predeterminado en funcion de optimizar la descripción de las diversas formas en que se lleva a acabo la cooperación científica, se establecieron las dimensiones e indicadores del concepto, lo cual corre el riesgo de no obtener la libertad de pensamiento que, la fenomenología hermenéutica aspira. Sin

embargo, sin relegar las concepciones teóricas, el análisis e interpretación busca objetivar las subjetividades de los informantes clave, únicamente respecto del concepto en estudio.

Por otra parte, es de tener en cuenta que el claustro universitario investigado pertenece a una comunidad educativa con una raigambre que data del siglo XIX, que además está asentada en una ciudad escuela, en tanto que dos siglos después buena parte de su sociedad, su economía e instituciones giran en torno a la actividad educativa, lo que explica la tradición pedagógica de sus pobladores.

La cuarta fase del análisis supone escribir-reflexionar acerca de la experiencia vivida respecto de la cooperación científica a través de sus dos dimensiones: cooperación del claustro y la orientación tutorial:

### **Cooperación del claustro**

Al tomar en cuenta la ocurrencia de menciones manifiestas en las entrevistas realizadas tenemos que:

En primer lugar, es la responsabilidad compartida: en la relación asesor/asesorado, donde el asesorado asume ciertos compromisos formativos que lo llevan, eventualmente, a la culminación de sus metas y el asesor se responsabiliza de dar indicaciones claras y precisas. La responsabilidad compartida entre educadores por otra parte, está más limitada a la disciplinariedad, cuando hay asuntos relacionados a su disciplina, los profesionales buscan asumir la responsabilidad o colaborar con el otro en aquello que es de su competencia.

En segundo lugar, respecto de la colaboración en la toma de decisiones el asunto se limita a la relación asesor/asesorado, donde es dable pensar que quien tiene el poder ha de ser el que se imponga en la toma de decisiones. El asesor ha de ser abierto al punto de vista del asesorado, sino quiere verse como intransigente. En cuanto a la relación entre profesionales, para la colaboración en la toma de decisiones hay un acuerdo tácito: el asesor es el único responsable.

También la cooperación del claustro en tercer lugar, se expresa con el indicador realización armónica de las tareas, aunque con menor ocurrencia, los docentes expresan alcanzar puntos de convergencia en el cumplimiento de metas de tal manera que son alcanzadas con buenos niveles de concordia, queda escondida la opinión del tesista quien podría tomar una posición antagónica. Las coocurrencias de cada indicador manifiestan homogéneamente la dimensión de la cooperación del claustro.

### **Orientación tutorial**

La dimensión de la cooperación científica denominada orientación tutorial tiene por indicadores: 1. Se indican las operaciones a realizar. 2. Se precisan con profundidad, 3. Se ejemplifican. Al seguir el mismo patrón de análisis anterior se puede ver que los asesores consistentemente indican las operaciones a realizar y levemente menos precisan con profundidad las tareas a realizar. Sin embargo, el recurso pedagógico de ejemplificar las acciones a realizar lo ejercen en muy escasa medida. La co-ocurrencia de los indicadores de la orientación tutorial sustenta lo expresado, donde indicar las operaciones a realizar es la tarea de orientación tutorial que los asesores de tesis manifiestan hacer principalmente dejando por fuera de la orientación tutorial, la precisión de detalles y los ejemplos orientadores.

La observación no participante arrojó, por otra parte, que la cooperación del claustro solo fue evidente con los indicadores colaboración en toma de decisiones y la realización armónica de las tareas y, por lo contrario, la responsabilidad compartida no se evidenció. La orientación tutorial mostró que muy frecuentemente se ponen ejemplos de las acciones a realizar y asimismo se indican cuáles son esas acciones que, además son precisadas con profundidad.

Los códigos emergentes denominados: antónimos de realización armónica y antónimo de responsabilidad compartida por considerar que se manifestaron con muy poca frecuencia, no han sido tomados en cuenta para este análisis. Sin embargo, plantean la inquietud para

ser estudiados exprofeso en función de la importancia que podrían revestir para la cooperación científica en los procesos de asesorías de investigación.

## **Conclusiones**

Finalmente, desde la perspectiva fenomenológica, basándose en la interpretación de las experiencias vividas por las personas, se pueden argüir que la población estudiada interpreta o conceptualiza en su vida cotidiana, como asesores de investigaciones, los siguientes conceptos:

### **Cooperación del claustro**

Los temas de investigación de tesis, independientemente que sea del asesor o del tesista, el asesor ha de adoptarla con colaboración o no del claustro. El tesista la asume y deberá demostrar interés, para conseguir apoyo constante por parte del asesor. La cooperación del claustro es, aunque constante, solo ejercida tangencialmente. Se impone el cometido de graduar al estudiante.

### **Orientación tutorial**

El asesor hace su parte indicando las operaciones a realizar, motiva al tesista y comparte los éxitos alcanzados. También son discutidas, argumentadas y aceptadas las orientaciones u opiniones de otros profesionales que, durante el proceso pudieran cooperar.

### **Cooperación científica**

Los temas de las investigaciones de tesis, independientemente que sean del asesor o del tesista o del claustro son adoptadas por el asesor. El tesista la asume y recibe del asesor indicaciones de las operaciones a realizar y motivación en aras de la realización de la tesis, también debe expresar vehemente interés en la tesis, como garantía para el apoyo constante por parte del asesor y finalmente al culminar

el cometido, comparten los éxitos alcanzados: el éxito del estudiante es el éxito del asesor.

El ejercicio de la cooperación científica del claustro para orientar a los tesisistas en la elaboración de sus estudios científicos en la Facultad de Ciencias Médicas en UNAN-León, alcanza buenos resultados en función de la alta tasa de terminación que reportan de los mismos y la presentación pública de los estudios en ciernes que los aspirantes llevan, donde las investigaciones tienen la oportunidad de ser sometidas a «otras opiniones» profesionales que contribuyen a la mejora cualitativa de las mismas. Sin embargo, el ejercicio de la cooperación del claustro bien podría tener maneras menos tangenciales y volverse más transversales durante el ejercicio de todo el proceso tutorial cuidando la eficiencia y la orientación tutorial tendría que verse más reforzada con ejemplificaciones de las tareas a realizar. Se alcanzaría con ello cualificar más la cooperación científica para la orientación tutorial de las investigaciones de los posgraduandos de la Facultad de Ciencias Médicas.

## **Referencias**

Álvarez Pérez, P. R. (2013). (PDF) La función tutorial del profesorado universitario: Una nueva competencia de la labor docente en el contexto del Espacio Europeo de Educación Superior. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/publication/308330960\\_La\\_funcion\\_tutorial\\_del\\_profesorado\\_universitario\\_una\\_nueva\\_competencia\\_de\\_la\\_labor\\_docente\\_en\\_el\\_contexto\\_del\\_Espacio\\_Europeo\\_de\\_Educacion\\_Superior](https://www.researchgate.net/publication/308330960_La_funcion_tutorial_del_profesorado_universitario_una_nueva_competencia_de_la_labor_docente_en_el_contexto_del_Espacio_Europeo_de_Educacion_Superior)

Anglat, H. E. D. de. (2011). Las funciones del tutor de la tesis en educación. *Revista mexicana de investigación educativa*, 16(50), 935-959.

Carnero, M., Ortiz, T., Arzuaga, M., Canfux, V., Guzmán, Y., Tarrío, C. O., Meneses, A., Torres, T., Rodríguez, M. A., González, N. Y., González, B., Hernández, H., Sanz, T., Hernández, A.,

Ojalvo, V., Travieso, D., Laurencio, A., Castellanos, A. V., García, A. & Curiel, L. (2019). *Psicología para la educación superior*. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela.

Escorcia-Caballero, R., & Gutiérrez-Moreno, A. (2009). La cooperación en educación: Una visión organizativa de la escuela. *Educación y Educadores*, 12(1), Article 1. <https://educacionye-educadores.unisabana.edu.co/index.php/eye/article/view/762>

Esparcia, A. C. (2011). Investigación e investigadores. Las revistas científicas como instrumento de comunicación. *Vivat Academia*, 1002-1017. <https://doi.org/10.15178/va.2011.117E.1002-1017>

Fernández, F. A., Fernández, S. R., Lavastida, M. F., & Fernández, S. (2007). *Didáctica: Teoría y práctica (Segunda)*. Editorial Pueblo y educación.

Fuentes-Guerra Soldevilla, M., García Cabrera, M. del M., Llorent García, V. J., & Olivares García, M. Á. (2012). La coordinación docente universitaria desde la percepción del alumnado. *REDU. Revista de Docencia Universitaria*, 10(2), 395. <https://doi.org/10.4995/redu.2012.6115>

Fuster G., D. É. (2019). Investigación cualitativa: Método fenomenológico hermenéutico. *Propósitos y Representaciones*, 7(1), 201-229. <https://doi.org/10.20511/pyr2019.v7n1.267>

Martínez, M. J. B., Yus, M. Á. M., & Currás, M. P. (2013). Coordinación docente e interdisciplinariedad: Análisis de su contribución a la adquisición de competencias docentes y discentes. *REDU: Revista de Docencia Universitaria*, 11(2), 443.

Meneses, A. (2017). *Modelo para la cooperación familia-escuela politécnica en los procesos de diagnóstico integral y formación del proyecto de vida profesional*. [Tesis no publicada, Universidad de Ciencias pedagógicas "Enrique José Varona"].

Meneses, A., Carnero Sánchez, M., & Arzuaga, M. (2016). Cooperación Familia-Escuela Politécnica en los procesos formativos. 14(1). <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu>

Perera F. (2000). La formación interdisciplinaria de los profesores de ciencias. Un ejemplo en el proceso de enseñanza/aprendizaje de las ciencias. [Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Pedagógicas]. La Habana, Cuba: Instituto Superior Pedagógico «Enrique José Varona»

Pérez, C. D. Z., Medina, D. E. M., & Rodríguez, K. C. A. (2016). Enseñanza de las competencias de investigación: Un reto en la gestión educativa. Atenas, 1(37), 1-14.

Recio, J. C. M., Pestaña, M. J. M., & López, M. F. B. (2012). Producción y dirección de tesis doctorales sobre publicidad en la universidad española (1971-2010). *Revista española de Documentación Científica*, 35(3), 433-452. <https://doi.org/10.3989/redc.2012.3.890>

Roman Collazo, C., Hernandez, Y., Campoverde, D., Baculima, J., & Tamayo, T. (2017). Habilidades científico investigativas de docentes de la Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. [https://www.researchgate.net/publication/324471615\\_Habilidades\\_cientifico\\_investigativas\\_de\\_docentes\\_de\\_la\\_Universidad\\_Catolica\\_de\\_Cuenca\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/324471615_Habilidades_cientifico_investigativas_de_docentes_de_la_Universidad_Catolica_de_Cuenca_Ecuador)

Santamaría, J. S. (2011). Evaluación de los aprendizajes universitarios: Una comparación sobre sus posibilidades y limitaciones en el Espacio Europeo de Educación Superior. 4, 16.

Senra Valera, A., & Senra Valera, M. (2008). La tesis doctoral de medicina Senra Varela. Díaz de Santos. <https://www.editdiazdesantos.com/libros/senra-varela-avelino-la-tesis-doctoral-de-medicina-L03008820101.html>



Slavin, R. E. (2014). Cooperative Learning and Academic Achievement: Why Does Groupwork Work?. [Aprendizaje cooperativo y rendimiento académico: ¿por qué funciona el trabajo en grupo?]. *Anales de Psicología / Annals of Psychology*, 30(3), 785-791. <https://doi.org/10.6018/analesps.30.3.201201>

Villa, A., & Yániz, C. (1999). Aprendizaje organizativo y desarrollo profesional. *Revista de curriculum y formación del profesorado*. [w.ugr.es/local/recfpro/Rev31](http://w.ugr.es/local/recfpro/Rev31)

Xin, S. & Carnero Sánchez, M. (2021). La cooperación en la formación de Licenciados en Lengua Española para no Hispanohablantes en la Universidad de La Habana. *Revista Cubana de Educación Superior*, 40(1).

# La legislación de la educación superior y la formación de profesionales en El Salvador

## The legislation of higher education and the training of professionals in El Salvador

<https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2221/2216>

Edwin Mazariego Flores

[edwin.mazariego@ues.edu.sv](mailto:edwin.mazariego@ues.edu.sv)

Universidad de El Salvador

Orcid: 0000-0003-1396-6026

### Resumen

Este ensayo que tiene por objetivo hacer una revisión crítica general de la legislación nacional respecto de la educación superior y la formación profesional actual. Para dar contexto a la revisión crítica, se hace un breve recorrido internacional sobre los temas y una reseña histórica de la legislación salvadoreña de la Educación Superior. La realización de la tarea en el contexto de cuarentena nacional a causa de la pandemia por covid-19 limitó metodológicamente, a la revisión de los archivos digitales del Ministerio de Educación, del Diario oficial, documentos relacionados al tema, periódicos y otras fuentes como las páginas web oficiales de las Instituciones de Educación Superior (IES), es necesario aclarar que la página web de la Unidad Técnica de Evaluación de la Universidad de El Salvador (COTEUES) se ha mantenido inhabilitada durante el mencionado período, por lo cual no fue posible utilizar esta importante fuente de datos; también se realizó una entrevista telefónica con un burócrata del Ministerio de educación; con los datos analizados se logró concluir sobre la inminente necesidad de reforma de las Leyes de educación superior, que se encaminen a garantizar la calidad de la formación profesional que supla las exigencias del mercado, pero además que forje profesionales innovadores, capaces de producir ciencia y no solo eficientes consumidores de ciencia y tecnología.

**Palabras claves:** Legislación educativa, Educación superior, Formación profesional, El Salvador

## Abstract

This essay that aims to make a general critical review of the national legislation regarding higher education and current professional training. To give context to the critical review, a brief international overview of the issues and a historical review of the Salvadoran legislation of Higher Education is made. The performance of the task in the context of national quarantine due to the covid-19 pandemic methodologically limited the review of the digital files of the Ministry of Education, the Official Gazette, documents related to the subject, newspapers and other sources such as the official web pages of the Higher Education Institutions (HEIs), it is necessary to clarify that the web page of the Technical Evaluation Unit of the University of El Salvador (COTEUES) has remained disabled during the aforementioned period, for which it was not possible use this important data source; a telephone interview was also conducted with a bureaucrat from the Ministry of education; With the analyzed data, it was possible to conclude on the imminent need to reform the Higher Education Laws, which are aimed at guaranteeing the quality of professional training that meets the demands of the market, but also that it forges innovative professionals, capable of producing science and not only efficient consumers of science and technology.

**Keywords:** Educational legislation, Higher education, Professional training, El Salvador

## Generalidades

Inicialmente, en las comunidades humanas las personas se dedicaban y especializaban empíricamente en diversas actividades que denominaban oficios; con la adopción de la ciencia en las sociedades, el establecimiento de las universidades, estos oficios se formalizaron, se normaron y se dispuso otorgar grados, licencias para el ejercicio de los mismos, se convirtieron en profesiones; no obstante, aun hoy algunos oficios juegan un papel importante en muchas sociedades.

«La educación universitaria [las licenciaturas e ingenierías<sup>1</sup>] aparece en las sociedades más evolucionadas como Francia, Inglaterra y Alemania; luego como parte de esta, surge el nivel de postgrado y su extensión posterior en los estudios posdoctorales» (Seas Tencio, 2017). Las necesidades sociales, los avances tecnológicos en general, exigieron a las profesiones diversificación a algunas y solo especializaciones a otras, que subsecuentemente, han dado paso a los posgrados universitarios. De tal manera que después de haber obtenido una profesión académica en una institución de educación superior, los profesionales buscan cualificarse, por diversos motivos con la obtención de un posgrado académico, especialidad, maestría o doctorado.

Los posgrados se forjaron de manera disímil en cada país, Dávila (2010) plantea que: «por influencia de diversos factores vinculados a las tradiciones educativas nacionales, los procesos de integración regional en marcha, así como también a las medidas e instrumentos de políticas educativas implementados» (p. 18). Los posgrados en general, maestrías, doctorados y también en el área de medicina la denominada especialidad médica, pueden comportar capacidades, aptitudes y destrezas diversas o poco equivalentes de país a país, lo cual dificulta las homologaciones o internacionalización

Con la modernidad y a causa de las innovaciones tecnológicas surgen cada vez más especializaciones que suponen estudios de posgrado, «la preparación de los graduados ya no puede considerarse finalizada en su tránsito por la formación de grado; en el posgrado se dan las condiciones para problematizar la realidad y generar respuestas innovadoras». Wilhelm (2001) tomado de (Saavedra, 2006). Es este el fin último de los posgrados, por tanto, es el reto a alcanzar, si se quiere lograr pasar de ser sociedades consumidoras de conocimiento a ser sociedades productoras de conocimiento y desarrollo.

---

1 Los corchetes son del autor del ensayo.

La UNESCO en Incheon Corea planteó como compromiso mejorar el acceso a la educación superior y la investigación con calidad:

Nos comprometemos a promover oportunidades de aprendizaje de calidad a lo largo de la vida para todos, en todos los contextos y en todos los niveles educativos. Ello incluye un mayor acceso en condiciones de igualdad a la enseñanza y formación técnica y profesional de calidad, a la educación superior y a la investigación, prestando la debida atención a la garantía de la calidad. (UNESCO, 2015).

Los Estados en la actualidad buscan la internacionalización de los posgrados, es decir, homologarlos, conseguir que no importando el país que fuera, el posgrado se refiera a la misma formación académica o profesional. La declaración de Bolonia (Ministros europeos de educación, 1999) quizá sea un muy buen ejemplo, los ministros europeos de educación acuerdan, entre otros aspectos, que la educación sea de dos ciclos: pregrado y grado, donde los grados son maestría y doctorado, el primero prerequisite del segundo, en su defecto, alcanzar la acreditación de suficiencia investigadora; un sistema de créditos homologables en cualquier país; el aseguramiento de la calidad. De tal manera que un grado académico obtenido en cualquier país de la comunidad europea es equivalente para el ejercicio profesional en cualquiera de los países miembros.

Está claro que la tendencia mundial en la formación superior ha de ir de la mano con la investigación científica dirigida a las mejoras sociales, lo cual exige el más elevado rigor científico; la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya se plantea la necesidad de elevar el rigor científico de los estudios de sus profesionales. En un estudio realizado en distintos países observaron que las investigaciones «presentan diversos grados de calidad, y en el futuro habrá que insistir en el rigor científico con el fin de reforzar la base científica de las políticas y la práctica». (Maher y Cometto, 2016).

A nivel latinoamericano, «la década del 90 se caracterizó por una expansión caótica de los posgrados públicos y privados en casi toda la región» (Rama Vitale, 2007, pág. 121); en la misma fuente se pueden apreciar las diferencias, en algunos casos acentuadas, en cuanto a las titulaciones, créditos, prerequisites, etc. Lo cual ha llevado al deterioro de la calidad de los posgrados, debido a una cierta anarquía de formación y titulaciones académicas en los Estados-nación, unos científicos sociales plantean que: «el auge de los posgrados fue seguido de una etapa de deterioro que iba paralelo a los procesos de evaluación y acreditación que comenzaron a jugar un papel central en el proceso de búsqueda de la calidad» (Salomón y Amador, 2013). Por supuesto que hay universidades que ya han trascendido la situación, y otras que solo recién inician el camino hacia la mejora cualitativa referida.

Una condición contribuyente a la baja calidad de los posgrados en muchos países de Latinoamérica se plantea de la siguiente manera: «la construcción del sistema de posgrado teniendo como centro de las universidades el grado, a diferencia de los países desarrollados donde el corazón científico, presupuestario y organizacional de la universidad es el posgrado, contribuye a profundizar esta problemática» (Barsky y Dávila, 2009). Quizá sea este aspecto el más generalizado en la región y contribuye a explicar, en buena medida, la baja tasa de publicaciones en revistas de impacto y el bajo aporte de patentes inscritas (Crespo-Gascón et al., 2019).<sup>2</sup>

La investigación, en la primera mitad del siglo XX en Centroamérica, parece que no representaba o no tenía el énfasis que en la actualidad posee. La educación perfilaba sus esfuerzos principalmente hacia la formación laboral profesional. No obstante, en la actualidad las universidades deben ser auténticos centros de investigación en estrecho vínculo con la docencia y la proyección social<sup>3</sup> como funciones sustantivas de toda institución de educación superior. Más

---

2 Consultado en <http://redc.revistas.csic.es/index.php/redc/article/view/1030/1657>

3 Extensión universitaria en muchos países

aún, un científico social suramericano plantea que: «no se es universidad si no se investiga» (Ayala Mora, 2015).

Aunados a los rasgos mencionados, en Centroamérica se puede apreciar, además, otro aspecto:

En Centroamérica se presenta un problema particular con los programas de posgrado: la mayoría nace desvinculado de las facultades por la idea de auto sostenibilidad asociada a los mismos, en una especie de autonomía que pretende, y muchas veces consigue, la autonomía académica y financiera para su desarrollo (Salomón y Amador, 2013).

En El Salvador, los posgrados están normados con la ley de educación superior (Legislativa, 2004) a través del Ministerio de Educación, a su vez, en la Universidad de El Salvador los posgrados efectivamente son creados y funcionan con fondos propios, fuera del presupuesto y sin contravenir las leyes del Estado, por tener su propia Ley orgánica, se rigen a través del Reglamento general del sistema de estudios de posgrado de la Universidad de El Salvador (AGU, 2010). Estas leyes surgen tardíamente para los posgrados si se toma en cuenta que desde 1977, plantea (Figueroa, 2020), se establece la primera Maestría en la UES y además sostiene que el surgimiento, desarrollo y organización de los estudios de posgrado en la UES no ha sido el resultado de una planificación estratégica central para el desarrollo académico de la institución.

Independientemente del tino de las legislaciones nacionales y las costumbres propias de cada país, la formación profesional exige la realización un estudio científico (tesis) relacionado a su formación, el cual tiene que defender ante un tribunal evaluador. Constituye un prerrequisito de graduación.

La bibliografía consultada plantea que las tesis son documentos escritos respecto de un tema particular, donde se expone un análisis crítico de la información o datos obtenidos con el fin de explicar de manera documentada, objetiva y rigurosa, un fenómeno determi-

nado cuyos resultados aportan soluciones a problemas particulares y/o generales, o son en sí mismos aportes teóricos al conocimiento. Pero, además, es un prerrequisito de graduación para los posgrados en la mayoría de las instituciones de educación superior, en tanto que, es un escrito donde se demuestra la formación, el manejo, la pericia, el conocimiento adquirido relacionado a algún aspecto asociado al grado académico a alcanzar. Es importante recalcar que hay una jerarquización en la exigencia de la propuesta de investigación según sea la titulación a obtenerse, así:

Las tesis de pre grado se caracterizan por el dominio de la profesión, la lógica de la investigación y argumentación básica; las tesis de maestría por el dominio temático especializado, la lógica de la investigación y el balance teórico; y la tesis de doctorado por el dominio metodológico, aporte original de la investigación y una propuesta fundamentada (Crespin y Cárdenas, 2013).

En relación a los posgrados, la Asociación Universitaria Iberoamericana de posgrados (AUIP) plantea que: «en general, los países y universidades identifican tres figuras académicas básicas del postgrado: la especialización, las maestrías y los doctorados» (AUIP, 2002). Y salvo breves excepciones toda Latinoamérica jerarquiza los posgrados de la misma manera.

Las tres formas de posgrado, universalmente aceptados son: especialización, maestría y doctorado, se caracterizan brevemente, a continuación:

**La especialización**, la AUIP plantea que «en numerosos países, la especialización no médica se define con una amplitud menor que la maestría, por lo general de un año o menos. Tiene un marcado carácter de profesionalización, de saber hacer y en algunos casos, no es reconocida como una titulación académica de postgrado, pues esta se reserva solo para maestrías o doctorados» (AUIP, 2002). La especialización médica en Latinoamérica comporta aspectos de asistencia médica y profundización de los conocimientos en el área disciplinar específica, profesionalizan-



te, durante tres años de formación y principalmente enfocada en el «saber hacer», de la misma manera que la especialización no médica.

**Las maestrías**, la figura de maestría es la más utilizada y existe en todos los países del área. El tipo de maestría mejor definido es el vinculado a la investigación, que en muchos casos se denomina Maestría en Ciencias. En América Latina, tiene características muy similares y por lo general, es reconocida mediante legislaciones nacionales. (Rama Vitale, 2007); (AUIP, 2002). Muchas universidades la incluyen como un requisito obligatorio para acceder al doctorado. También se establece una diferencia entre las maestrías; la maestría profesional, una suerte de cualificación extra en una parte específica de una disciplina, muy parecida a la especialización en medicina; y la maestría académica o científica, ligada a la investigación en general, al hacer científico en una parte específica de una disciplina.

**La maestría profesional** en muchos casos es vista como una especialización natural en una profesión en términos de laboralidad, únicamente; y por otra parte se plantea que la maestría académica es «el proceso de formación posgraduada que proporciona a los graduados universitarios un dominio profundo de los métodos de investigación, una amplia cultura científica y conocimientos avanzados en un campo del saber» (Gálvez González, et al., 2011).

**Los doctorados**, suponen una formación académica de alto nivel que busca preparar «para la investigación original que genere aportes significativos al acervo de conocimientos en una disciplina, demostrando haber superado distintos niveles de complejidad en el saber que permitan avanzar, desplazar o aumentar las fronteras de un campo del conocimiento». (Rama Vitale, 2007).

## 1. La legislación de la educación superior en El Salvador. Reseña histórica

Desde el establecimiento del Estado salvadoreño se fue pensando en instaurar la Educación superior, García (1950) ubica hacia 1825 un incipiente esfuerzo por formalizar la Educación superior en el recién formado país; durante la presidencia de Juan Vicente Villacorta Díaz se dicta un decreto legislativo con fecha de abril de 1825, mandando crear un colegio de educación científica para jóvenes capaces, donde se abran cátedras mientras se constituye el plantel general de estudios, además en el artículo 3 plantea:

Se pondrá un Rector y Vicerrector que, con los catedráticos o teniendo ellos mismos las cátedras, cuiden de los alumnos, arreglado al estatuto provisional que formará el gobierno, de acuerdo con el padre obispo electo, el que a su tiempo se presentará a la Asamblea para obtener su aprobación. (García M. A., 1950, p. 1).

Parece que no se concretó el esfuerzo porque 16 años después hubo la necesidad, durante la presidencia de Juan Lindo, de dictar un Decreto el 16 de febrero de 1841, de erección de la Universidad de El Salvador, por la Asamblea constituyente del Estado del Salvador [sic] (García M. A., 1950, pág. 6). Se mantuvo por 124 años, donde la Universidad de El Salvador era la única institución de educación superior en la nación.

Hacia 1854 se decretaron unos Estatutos Universitarios que, entre otros aspectos, «definían los grados académicos otorgados, los cuales se constituían en una pirámide jerárquica basada en bachillerato, licenciatura y doctorado». (MINED, 2000, p. 32) Por tres décadas la universidad gradúa profesionales bajo estos estatutos.

Hasta que en 1882, también García (1956) refiere que durante la presidencia de Rafael Zaldívar, por decreto legislativo:

Art 1º. -Se sustituye el título de Licenciado en la República, por el de Doctor, quedando en consecuencia derogados el artículo 14, y el inciso 17 del artículo 20 de los Estatutos universitarios.

Art 2º. -Los Licenciados que quieran que se les extienda el título de Doctor, lo solicitarán verbalmente de la Secretaría de la Universidad Central, previo el pago de los derechos de reposición de dicho título asignados por el arancel de los referidos Estatutos (p. 106).<sup>4</sup>

Sin más formación académica, por decreto, parece que es así como desde 1882 hasta mediados del siglo XX se mantiene por costumbre esa titulación, Avalos G.(2010) recoge en una tabla la carreras que hacia 1949 impartía la Universidad de El Salvador(UES) en sus siete Facultades de entonces y enlista diez doctorados (p. 75). Todas las demás carreras existentes y las que se fueron creando para la década de los 60's y 70's volvieron al grado de licenciatura, el doctorado en Derecho vuelve a titularse como licenciatura un poco más tarde; únicamente Medicina y Odontología, con acomodos convenientes de Ley y extensión en el tiempo para graduarse convirtiendo en unidades valorativas los ejercicios prácticos de las rotaciones por diversos servicios hospitalarios<sup>5</sup>, mantienen aún el título de grado nominal de Doctor, sin con ello suponer un posgrado.

Ya entrados en la modernidad, muchos aspectos administrativos han cambiado, pero persisten resabios o formas de enseñanza o modelos educativos del pasado. (Rodríguez Rivas, 2015); (Gómez Arévalo, 2010) que, si bien estuvieron a la altura de la época, porque parece que produjeron buenos resultados, en la actualidad no demuestran ser lo mejor para la internacionalización de la formación superior y la calidad. La legislación respecto de grados y/o posgrados académicos es un buen ejemplo, aún ahora en el siglo XXI.

---

4 Publicado en el Diario oficial N.º. 59 del 10 de marzo de 1882.

5 Para la UES: Plan de estudios. Publicado en el Diario oficial 08 de enero de 1998 N.º.4 Tomo 338.

Se resumen en la siguiente tabla las leyes de educación que han regido la misma hasta la actualidad, para así, con el apoyo de estos datos, realizar algunas reflexiones críticas respecto de la legislación actual de los posgrados en El Salvador.

**Tabla 1.** *Cuerpo de Leyes de educación superior en El Salvador*

Fecha	Ley
Marzo de 1965	Ley de universidades privadas (Legislativa, 1965)
Nov. de 1995	Ley de educación superior (Legislativa, 1995) <sup>6</sup>
Ago. de 1996	Reglamento general de la Ley de educación superior (Presidencia, 1996) <sup>7</sup>
Dic. de 1996	Ley general de educación (Legislativa, 1996) <sup>8</sup>
Nov. de 2004	Ley especial para la educación superior, (Legislativa, 2004) <sup>9</sup>
May. de 2005	Ley general de educación (Legislativa, 2005) <sup>10</sup>
May. de 2009	El Reglamento general de la Ley de educación superior. Decreto ejecutivo N.º65 (MINED, 2009) <sup>11</sup>
Ago. de 2010	Reglamento general del sistema de estudios de posgrado de la Universidad de El Salvador (AGU, 2010)

*Fuente.* Mazariego (2020). Elaboración propia.

Se analizan a continuación los rasgos más destacados de algunas de las Leyes o reglamentos de la tabla anterior:

- La Ley de universidades privadas consiguió que para la década de los 80’s y mediados de los 90’s, hubiera un repunte de fundación de Institutos de educación superior; comenta uno quien fuera Rector de la Universidad de El Salvador, por

---

6 Publicado en el Diario Oficial N.º. 236, Tomo 329, de 20 de diciembre de 1995

7 Publicado en el Diario Oficial N.º. 157, Tomo 332, de 26 de agosto de 1996

8 Publicado en el Diario oficial N.º 242 Tomo 333 el 21 de diciembre de 1996

9 Publicado en el Diario oficial N.º 216 Tomo 365 el 19 de noviembre de 2004

10 Publicado en el Diario oficial N.º 108 Tomo 367 el 13 de junio de 2005

11 Incluyó Reformas asociadas al Reglamento Especial de Incorporaciones. Publicado en el Diario oficial N.º 39 Tomo 394 el 27 de febrero de 2012.

unos meses en el año 1979: «se llegaba a la extraordinaria cantidad de 42 Universidades, eso sin contar 24 institutos tecnológicos de la más diversa naturaleza y del más amplio nivel, con lo cual se llegaba a 66 instituciones de educación superior» (Badía Serra, 2000). De similar manera opina el director de gestión de la calidad de una universidad privada respecto del período comentado (Castellón Murcia, 2010).

La eclosión de instituciones de educación superior no suponía calidad en la formación, dejaba múltiples vacíos; «el sistema permitió llamar universidad a cualquier asociación de personas que apenas hacían docencia, sin organización académica, que graduaba a cualquier interesado con título de bachiller y a veces hasta sin este» (MINED, 2000).

- La Ley de 1995 viene a sustituir a la Ley de universidades privadas que databa de 1965, la cual, por no tener normas claras, mecanismos con el suficiente rigor que garantizará la calidad en la formación, había llevado a la eclosión de universidades, algunas sin las normas más básicas de calidad en la formación, como ya se mencionó. Prontamente consiguió la cesación de muchas IES.
- Del Reglamento general de la Ley de educación superior (Presidencia, 1996)<sup>12</sup> un rasgo destaca en relación al trámite de aprobación de las instituciones de educación superior (IES), la aprobación de nuevas carreras, planes y programas: Aún cuando la idea era poner orden, mejorar la calidad de las IES, con esta ley es un trámite tan laxo, como expedito; está consignado en dos fases, una provisional y otra definitiva; plantea que la Dirección Nacional de Educación Superior recibe la solicitud y si tuviera inconvenientes, hará las observaciones pertinentes al solicitante, y devuelve la solicitud para que la IES enmiende los problemas (Art. 4), además, remite la solicitud al Consejo de Educación Superior, para que otorgue su visto bueno o le haga observaciones, y en un plazo de treinta días con o sin la opinión del Consejo, la Dirección emitirá su decisión.

<sup>12</sup> Publicado en el Diario Oficial N.º. 157, Tomo 332, de 26 de agosto de 1996

Además, el reglamento en su artículo 12 dice: la Dirección Nacional de Educación Superior deberá cumplir, en los procedimientos de aprobación provisional o definitiva de nuevas instituciones, creación de dependencias y aprobación de nuevos planes y programas de estudios, con el término estipulado en el Art. 48 (Toda solicitud hecha al Ministerio de Educación o al Consejo de Educación Superior, en lo pertinente a este, sobre autorización provisional o definitiva, aprobación de instrumentos legales y demás a que se refiere esta Ley, deberá ser resuelta en el término máximo de noventa días.). Es una Ley que más que normar a las IES a brindar educación superior con calidad, norman al estado para ser expedito proveyéndoles prontas resoluciones a sus peticionarios. De no cumplirse la resolución de la solicitud en el plazo estipulado por la Ley, se da por aceptada la petición, plantea la Ley.

Otro aspecto cargado de idealismo que la Ley plantea, es la naturaleza jurídica de las IES privadas «sin fines de lucro» y los excedentes que tengan deberán invertirlos en investigación. Para febrero del 1999 el rector de una universidad privada, respecto de la reforma educativa realizada cuatro años antes, comentaba sobre las evaluaciones realizadas bajo esta Ley:

No se puede obviar un hecho significativo relacionado con el status legal de las Universidades, la Educación Superior en El Salvador, es por Ley sin fines de lucro, y es evidente en el país, plantea Ruiz (1999) el lucro ha sido disfrazado con encubrimientos revolucionarios, liberales y progresistas; «el Sistema de Evaluación no pudo evidenciar esta situación, bien sea por falta de mecanismos o por valentía, el hecho es que se soslayó este tópico no quedando al descubierto ninguna universidad que se lucraran a costa de los estudiantes» (p. 27).

- También, el artículo 18 del «Reglamento general de la Ley de educación superior» respecto de la Universidad de El Salvador expone que: atendiendo a su autonomía y por contar con ley orgánica propia, aprobarán la creación de sus dependencias académicas, elaborarán y aprobarán sus planes y programas de estudio de conformidad con la misma, pero deberán hacer

publicar los acuerdos de aprobación en el Diario Oficial, de conformidad al Art. 75 de la Ley y solicitarán a la Dirección Nacional de Educación Superior su registro.

El asunto de la naturaleza jurídica «sin fines de lucro» de las IES privadas se ha mantenido hasta la actualidad y están prestos a defender sus empresas ante cualquier amenaza, así por ejemplo: ante la posibilidad de que la Asamblea legislativa aprobara un decreto para paliar el impacto económico negativo en la población, durante la actual cuarentena nacional por el Covid-19, que mandarían a los colegios y universidades privadas a disminuir en el 50% las cuotas de colegiatura de sus estudiantes, las IES privadas se aprestan solicitando fondos del Estado para que compensen el 50% de la reducción de las cuotas (AUPRIDES, 2020)<sup>13</sup> y le recuerdan al Estado que los estudiantes que ellos atienden no representan gasto alguno al estado (CONARES, 2020)<sup>14</sup>.

En El Salvador es un tema tabú, en el sentido de significar una idea inaceptable por considerarse indebida o amenazante para el orden social o cultural, decir que las universidades privadas son empresas con fines de lucro cuyo objetivo de comercio es la Educación superior y su objeto final de transacción es el otorgamiento de títulos; plantear esto puede suponer severas críticas por no querer «aceptar el desafío de consolidar un cambio benéfico». (du Gay, 2003) Planeaba respecto del *ethos* empresarial de la nueva gestión pública y las privatizaciones a principios de siglo en Inglaterra.

Actualmente, el Ministerio de educación a través de la Ley de educación superior contempla dos tipos de Educación Superior, la Educación Tecnológica y la Educación Universitaria. Asimismo, los grados académicos del nivel de educación superior pueden ser: a. Técnico, b. Profesor, c. Tecnólogo, d. Licenciado o Arquitecto o Ingeniero; e. Maestro, f. Doctor y, g. especialista (Art. 5). No tiene contemplado

---

13 Publicado por la Asociación de Universidades Privadas de El Salvador en La Prensa Gráfica. Viernes 01 de mayo de 2020. p.43

14 Publicado por la Asociación Consejo de Rectores de El Salvador en la Prensa Gráfica. Sábado 02 de mayo de 2020. p.35

de manera explícita los posgrados. Podría pensarse tácitamente en los posgrados cuando en el artículo 12 de la Ley dice: «el grado de Maestro es una especialización particular posterior al grado de Licenciado, Ingeniero o Arquitecto»; lo que formalmente imposibilitaría a alguien con Doctorado en medicina u odontología a estudiar Maestrías.

La palabra posgrado no aparece en la Ley general de educación, tampoco en la Ley de educación superior, ni en el Reglamento de educación superior. Sin embargo, es curioso como en los reportes oficiales del Ministerio de educación (MINED, 2018) (MINED, 2016), etc. consuetudinariamente hacen alusión a los posgrados, los cuales no tienen asidero legal, según la legislación vigente.

Por otra parte, la Ley consigna la investigación en cuanto a Especialidades, Maestrías y Doctorado, de la siguiente manera, más bien abstracta: a. Para la maestría es exigible para «el desempeño profesional y para el trabajo académico de investigación y docencia»; b. Para Doctor desarrollar y aprobar una tesis producto de investigación<sup>15</sup> (Legislativa, 2004); y c. Para Especialidades no hace ninguna alusión a la investigación.

Se transcribe a continuación el artículo 13 de la Ley de educación superior, porque este plantea inconsistencias importantes entre los cánones internacionales anteriormente referidos y la legislación de la educación superior nacional:

### **Grado de Doctor**

Art. 13. El grado de Doctor es el nivel de formación posterior al grado de Licenciado, Ingeniero, Arquitecto o de Maestro, para avanzar en el conocimiento de las ciencias, arte y técnica.

Para la obtención de este grado, es necesario desarrollar y aprobar una tesis producto de investigación, ejecutada en una determinada rama científica. El plan de estudios tendrá una duración

---

15 Artículo 12.



no menor de tres años y comprenderá un mínimo de noventa y seis unidades valorativas.

Sin perjuicio de los incisos anteriores, se podrá acceder al grado de Doctor en medicina y Doctor en odontología sin haber obtenido previamente otros grados académicos; pero en todo caso, la sumatoria de las unidades valorativas, que el aspirante al grado de Doctor debe ganar, no podrá ser inferior a doscientas veinticuatro unidades valorativas, con un plan de estudios de una duración no menor de siete años.

Son deducibles los siguientes comentarios:

- La ambigüedad del grado de Doctor. Doctorados de grado y Doctorados de «posgrado». El prerrequisito de bachillerato para los Doctorados en Medicina y Odontología. Y los prerrequisitos de Licenciatura, Ingeniería, Arquitectura o Maestría para otros Doctorados.
- La Maestría como prerrequisito es opcional para doctorarse, no es necesaria, luego cualquier IES podría ofertar doctorados sin exigir la Maestría (donde de regular se forjan o afinan las competencias investigativas).
- En general el asunto de los grados académicos está ligado al tiempo lectivo de formación, más que a la profundización y producción de conocimientos en áreas científicas; con lo cual si una profesión modifica su currículo y extiende su tiempo de formación invirtiéndolo en prácticas laborales de la profesión traducidas a 224 unidades valorativas<sup>16</sup>; cualquier IES, reclamando igualdad de derecho ante la Ley, bien podría exigir y solicitar instaurar nuevos Doctorados de grado.

Como ya fue mencionado, la Universidad de El Salvador tiene un Reglamento general del sistema de estudios de posgrado<sup>17</sup>, este

---

16 Unidad valorativa: equivaldrá como mínimo a veinte horas de trabajo del estudiante, atendidas por un profesor, en un ciclo de dieciséis semanas, entendiéndose la hora académica de cincuenta minutos. Ley de educación superior. Art.5

17 Asamblea General Universitaria. Acuerdo N.º. 57/2009-2011 (VII)

reglamento si tiene en consideración los grados académicos de Licenciatura, Ingeniería, Arquitectura, Doctorado en medicina o en cirugía dental como grados prerequisite para aspirar al posgrado de Maestría, y este a su vez, prerequisite para optar al grado de Doctor<sup>18</sup>; la Universidad de El Salvador hasta el año 2020 no tiene graduados de programas doctorales.

Este reglamento mantiene el desacierto de normar las especialidades solo médicas u odontológicas, dejando fuera toda suerte de especialidad de otras áreas de la ciencia como la agronomía, veterinaria, derecho, economía, etc.; ciñe además las especialidades a la formación técnica, al «saber hacer», coartando la formación científica investigativa; en el artículo 28 del referido reglamento, de los estudios de especialidad dice: «los estudios de Especialidad tienen como objetivo profundizar y ampliar conocimientos y destrezas que requiere el ejercicio profesional en un área específica de la salud. El Grado de Especialista para médicos y odontólogos, se obtiene posterior al grado básico de Doctor y conduce al desarrollo de conocimientos, habilidades y destrezas profesionales en un determinado campo del área de la salud» (AGU, 2010). Imposibilitando de esta manera la formación de currículos con perspectiva científica, transformadora de la realidad, capaces de trascender las habilidades y destrezas de un campo de la salud; dejando la formación al mero acto de «operarios» en algún campo de la medicina.

Con esta legislación, las IES se rigen y funcionan. Las imprecisiones y vacíos en las leyes permiten y potencian arbitrios y procedimientos, a veces, carentes de lógica. Las reformas de la Ley de educación superior en El Salvador en general funcionan y han respondido, como en el caso peruano donde: «las inercias institucionales vinculadas al poder de las universidades en conjunto, con una ideología de mercado aun fuertemente presente, más bien debilitaron al Estado en su proyecto regulador» (Benavidez, et al., 2016).

---

18 Artículos 26, 27 y 28 del Reglamento general del sistema de estudios de posgrados UES.

Toda ley implementada tendrá sus aciertos y desaciertos y «puede que nunca una política sea perfecta para resolver satisfactoriamente todas las debilidades dentro de un sistema educativo; pero los defensores de la educación y formuladores de políticas públicas, siempre deben comprometerse en revisar las prácticas existentes y mejorarlas (Cuéllar-Marchelli, 2003)<sup>19</sup>, *cientista de la Columbia University*. USA, opinaba al respecto, 8 años después de creada la reforma educativa del 1995 en El Salvador, dirimir este asunto en un Estado como El Salvador, donde el proyecto privado prima sobre lo público es difícil, es pensable que las leyes seguirán redactándose en función del interés de las empresas de educación; en palabras de John HYDE, director del *Austraian Institute for Public Policy*:

El «consenso» final es el mercado. Es la transacción por acuerdo entre personas corrientes. La única alternativa a la economía de mercado en la economía dirigida, en la que una elite, los privilegiados, toma decisiones y obliga, con el respaldo policial<sup>20</sup> a la gente corriente a aceptar transacciones que no desean y que la elite privilegiada puede... vigilar con el patrocinio del gobierno y del Estado (Kenway, 1991, pág. 172).

## 2. La formación de profesionales en El Salvador

El órgano rector de la Educación Superior en El Salvador es el Ministerio de Educación registra y coloca con acceso libre los documentos relacionados a la educación a nivel nacional. Basándose en estas fuentes se puede tener un panorama oficial de la situación de la formación profesional en el país.

En El Salvador están autorizadas a brindar formación en educación superior 24 universidades, 11 institutos especializados y 6 institutos tecnológicos, entre públicos y privados. La oferta de formación se consume en coherencia con la demanda que crece año

19 La traducción es del autor.

20 Léase política pública.

con año (ver Tabla 3). Cada carrera o especialización ofertada por una IES deberá estar autorizada por el MINED (ver Tabla 2).

Las instituciones públicas son pocas respecto de las privadas; una universidad pública y 23 privadas; 5 institutos especializados públicos y seis privados; y de los seis institutos tecnológicos, divididos a partes iguales entre públicos y privados. Cada IES tiene un número de carreras autorizadas por el MINED, se muestran en la tabla 2 las carreras autorizadas y activas de cada IES, se entiende por carrera activa a la suma de las carreras autorizadas y aquellas que, habiendo finalizado su período de vigencia, gozan de una etapa extemporánea otorgada por el MINED con el objetivo de que sus estudiantes culminen sus estudios, sin aceptarse nueva matrícula.

La oferta académica autorizada por el MINED a mayo de 2019 (ver Tabla 2) plantea una inquietud, cuando se ven discrepancias sustantivas anunciadas por IES en medio digitales de publicidad; como por ejemplo la Universidad Francisco Gavidia a mayo de 2019 tiene 57 profesiones autorizadas y a enero del 2020 ofertan 80; la Universidad José Matías Delgado tenía autorizadas 56 profesiones y oferta 72 o el Instituto Especializado de Educación Superior Escuela de Comunicación Mónica Herrera tenía autorizadas 4 carreras y publica su oferta académica en 33 <sup>21</sup>.

Este dato manifiesta que la unidad o departamento encargado en el MINED para autorizar nuevas carreras a las IES actúa de forma expedita, eficiente o, que son laxos para con las aprobaciones porque la Ley de educación superior les concede esas licencias en función de estar acreditadas. En cualquier caso, es un exceso instituir u ofertar 25 carreras demás en alrededor de 8 meses transcurridos. Pone en evidencia un uso de la acreditación: la posibilidad legal de «armar» en unos pocos meses tantas carreras como se antoje y matricular interesados, respondiendo al mercado clientelar. La acreditación es así en la actualidad, independientemente de lo útil que pudo ser en un principio para la regulación de las IES.

---

21 Tomado de <https://universidades.sv/universidades>, Consultado 26/01/2020. 12:31pm

También puede ser explicado desde la constitución de la ley, en cuanto a la formación del «Consejo de educación superior», artículo 53 de la Ley de educación superior, donde queda establecida una entidad consultora cuyos miembros, buena parte del sector privado, con facilidad, pueden ser parte y juez (directa o indirectamente), de las querellas, solicitudes, socios, etc. de las instituciones de educación superior.

La conformación por ley del Consejo de Educación Superior, aunque es únicamente una entidad consultora, la empresa privada tiene preponderancia y por tanto, buscarán el mantenimiento lo más holgado posible de las empresas que representan. El capital social del Consejo, sabrá moverse en pos de sus intereses; en sentido bourdieuano «Capital social está constituido por la totalidad de los recursos potenciales o actuales asociados a la posesión de una red duradera de relaciones más o menos institucionalizadas de conocimiento y reconocimiento mutuos». (Bourdieu, 2000, pág. 148).

En consecuencia, el poder ejercido por el capital social en el Consejo es fáctico, en el sentido que «para Bourdieu, las redes de relaciones son producto de estrategias de inversión, individuales o colectivas, conscientes o inconscientes, que buscan establecer o reproducir relaciones aprovechables en el corto o el largo plazo». (Vargas, 2002)

Es menester manifestar la importancia que tiene para la formación superior los puntos de vista de los actores sociales externos y el mercado laboral de los profesionales. En una entrevista establecida con un burócrata del MINED<sup>22</sup>, al respecto plantea: «es de recordar que la educación superior debiera estar de la mano con las empresas donde eventualmente serán contratados los profesionales, quienes son además los mejores conocedores de las habilidades y destrezas profesionales que demandan para la producción de bienes». Aunque esta posición deja afuera a profesiones que las empresas no utilizan

---

22 Entrevista telefónica realizada con un Doctor burócrata del MINED, en mayo 17 de 2020.6:45pm.

o utilizan en escasa medida, es importante tener en cuenta esa perspectiva tan real como pragmática.

En última instancia las IES tienen por cometido nacional la formación profesional de individuos competentes, capaces de desarrollarse en el mundo laboral de sus respectivas profesiones, pero además es deseable que sean capaces de brindar soluciones e innovaciones en su entorno de acción, con visión humanística, propositiva social, lo cual está solo sugerido en la Ley.

Sin hacer alusión a los aspectos cualitativos de la formación, cuánto contribuyen las IES en la producción de profesionales formados en educación superior, refiriéndose a la eficacia o la capacidad de lograr el efecto que se desea o se espera: graduar profesionales para la nación.

Para tener una idea, somera de este aspecto de las IES se exponen en la siguiente tabla la matrícula bruta por cada IES en los años 1997 y 2013 para comparar, cinco años después para las universidades y dos o tres años después para los institutos de formación superior con el número bruto de culminación o graduados para los años 2002 y 2018, respectivamente. Se denominará, únicamente para este fin, taxativamente, tasa de culminación al cociente resultante de graduados entre matriculados de las IES en los mencionados años.

Es claro que esta comparación no toma en cuenta la deserción escolar, las incorporaciones y otros aspectos que pudieran intervenir en los datos. Sin embargo, la comparación provee una idea general de los individuos que en un «año primero» iniciaron sus estudios y de los individuos que al año último teórico esperado de formación, se graduaron en cada IES. Además, los años de comparación elegidos son en función de comparar una cohorte donde ya estaban establecido los cambios generados por la puesta en marcha de las leyes de educación superior de 1995 y 2005.

**Tabla 2.** *Tasa culminación de IES. 2002 y 2018. El Salvador*

Instituto especializado		Datos 1999			Datos 2015			
1	IEES	17/ 13	92	84	0.913	460	106	0.230
2	IECMH A	4/ 1	156	60	0.385	441	81	0.184
3	IEFD P	1/ 4	NA	NA	NA	8	3	0.375
4	IEANSP P	1/ 1	NA	NA	NA	119 (año 2016)	92	0.773
5	IECCSA	2/ 1	NA	NA	NA	223	12	0.054
6	IEEM P	3/ 2	283 (año 2000)	73 (año 2003)	0.257	412	56	0.136
7	IEEN A	4/ 3	318	69	0.217	783	149	0.190
8	IEPS	4/ 4	NA	NA	NA	2380 (año 2016)	696	0.292
9	ITCA-FEPADE AP	49/ 22	3141*IT	992	0.031	5244	2160	0.412
10	IEFE/A P	4/ 4	NA	NA	NA	715	306	0.428
11	IEEAE A	2/ 1	235	83	0.353	278	114	0.410

IES *		Carreras autorizadas a 05/2019 // Activas	Matrícula 1997	Graduados 2002	Tasa de culminación 2002	Matrícula 2013	Graduados 2018	Tasa de culminación 2018
Universidad								
1	UAE	9/ 9	2173	161	0.074	548	39	0.071
2	UASA	10/ 8	688	78	0.113	1366	181	0.133
3	UCES A	43/ 31	1689	238	0.141	5600	1097	0.196
4	UCA A	50/ 47	7484	893	0.119	8445	1240	0.147
5	UCADD	99/ 10	714	47	0.066	813	100	0.123
6	UES P	150/ 83	24500	2209	0.090	48212	4318	0.090
7	UDO A	49/ 45	4397	295	0.067	4119	741	0.180
8	UDS	14/ 13	1320	141	0.107	2819	306	0.109
9	UDB A	61/ 51	2134	147	0.069	5567	1159	0.208
10	UAB A	28/ 24	5652	131	0.023	9643	1687	0.175
11	UJMD A	56/ 45	3954	258	0.065	7608	695	0.091
12	UEES A	38/ 34	2460	302	0.123	3631	476	0.131
13	UFG A	57/ 57	8492	303	0.036	12856	1222	0.095
14	UGB A	37/ 30	3967	232	0.058	7043	1169	0.166
15	ULS	12/ 10	295	33	0.112	1944	220	0.113
16	UMA	22/ 17	9837	655	0.067	5348	797	0.149
17	UOAR	7/ 6	297	24	0.081	1301	227	0.174
18	UNSS	10/ 10	1556	160	0.103	682	51	0.075
19	UP	10/ 8	1775	100	0.056	2406	367	0.153
20	UPed.ES	39/ 45	1631	432	0.265	5713	868	0.152
21	UPolES	12/ 10	1764	200	0.113	998	94	0.094
22	USAM A	23/ 19	2683	213	0.079	3741	425	0.114
23	UTL	8/ 8	561	37	0.066	461	45	0.098
24	UT A	62/ 46	13184	958	0.073	20614	2129	0.103

Instituto Tecnológico		Datos 1999				Datos 2015		
1	ITAES	2/ 2	NA	NA	NA	46	5	0.109
2	ITCh AP	8/ 8	77 (año 2000)	32	0.415	476	226	0.475
3	ITU P	6/ 3	135	87	0.644	198	12	0.061
4	ITENA P	1/ 1	110	31	0.282	307	89	0.290
5	ITETS	2/ 2	495	44	0.089	652	155	0.238
6	ITSG	2/ 2	NA	NA	NA	59	20	0.339

*Fuente:* Mazariego (2020). Elaboración propia con base a datos obtenidos a través del Sistema Nacional de Información y Estadísticas de Educación Superior (SNIEES) por Instituciones de Educación Superior públicas y privadas. [www.mined.gob.sv](http://www.mined.gob.sv)

\*Códigos de IES ver anexo 1. A= Institución acreditada o re acreditada

\*IT = Instituto Tecnológico. P= Institución pública NA = No aplica

Respecto de la condición «opcional» de acreditarse o re-acreditarse que pueden gozar las IES, el cuadro anterior expone la tendencia a recibir mayores matrículas aquellas IES con acreditación, con la excepción clara de la Universidad pública que sin estar acreditada, supera la matrícula con creces respecto de las demás, explicada posiblemente por las muy bajas cuotas de escolaridad en comparación de las IES privadas.

Tal parece que la acreditación se explota en función «mercado-lógica», más que de expresión de calidad de la formación; la acreditación implica también la atención a proyección social e investigación. En este último punto las IES hacen malabares a fin de mostrar inversión y avances en investigación. Además, la acreditación tiene por criterios o indicadores a evaluar o a acreditar: a. población estudiantil, b. estudiantes por docente, c. % docentes tiempo completo, d. %docentes horas clase, e. %docentes con posgrado f. libros por estudiante, g. estudiantes por computadora y h. estudiantes por computadora con internet (MINED, 2020).

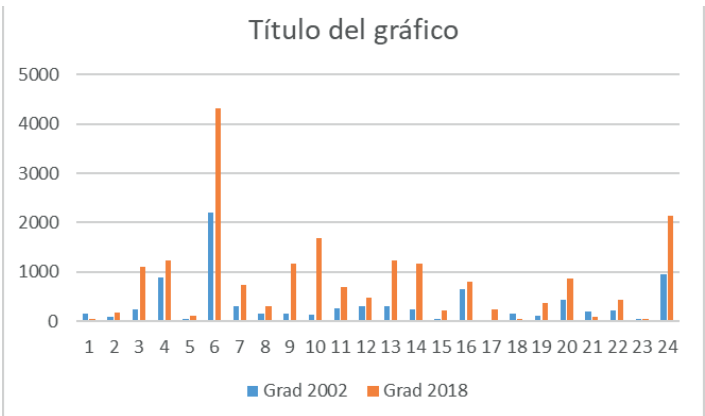


Los parámetros a evaluar para acreditar no están mal pero son insuficientes, las normas legales no exigen la acreditación y los requerimientos exigidos para aquellas IES que lo solicitaran, son solo trámites y disposiciones a cumplir, que bien pueden suponer manio-bras administrativas a acomodar. La condición ausente es la calidad en la formación académica, dar cuenta de ello, las leyes de educación superior no exigen la calidad en la formación. Asimismo, la investi-gación no es exigencia legal, queda a criterio de las IES. Si son obli-gación de Ley algunos aspectos administrativos a cumplir.

Al analizar la tasa de graduación de las cohortes 2002 y 2018, se tiene que para el 2002 las IES graduaban en promedio el 9% del total de matriculados cinco años antes; para 2018 ha aumentado al 13%, hay un aumento del 4%. Aunque este dato bruto adolece de muchas variables no contempladas, como aquellos estudiantes que se graduaron con algunos retrasos los siguientes años, atisba sobre la eficiencia con que las IES están graduando a sus estudiantes.

Se grafican y comparan a continuación los graduados de los años 2002 y 2018, para visualizar la producción de profesionales en El Salvador por parte de las universidades autorizadas, a cada núme-ro del eje de las «equis» corresponde una universidad.

**Figura 1.** *Comparativo de graduados de los años 2002 y 2018*



Fuente: Mazariego (2020). Elaboración propia a partir de los datos de la tabla.

Se puede apreciar en la figura 1 la comparación de graduados de los años 2002 y 2018. Hay una tendencia de las universidades a aumentar el número de estudiantes que gradúan. La universidad pública (# 6 en el gráfico) tiene mayor número de graduados en función de que sus matrículas son superiores en comparación de las universidades privadas en individual.

El aumento en 4% en la tasa de culminación podría atribuirse a la legislación 2005; y las pocas cantidades de estudiantes graduados podrían significar en cierta medida, fracaso de la institución educativa o que tiende a extinguirse, la gráfica muestra tres universidades en tal situación, las correspondientes a los números 1, 18 y 23 (las Universidades Albert Einstein, Nueva San Salvador y Técnica latinoamericana), cuyos graduados para el año 2018, fueron 31, 51 y 45 profesionales, respectivamente.

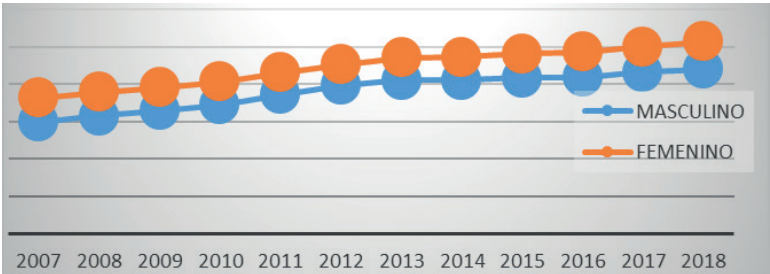
Para evidenciar con mayor acierto el comportamiento en las matrículas por parte de las IES en El Salvador, a continuación, se exponen por condición de pública o privada y sexo las matrículas brutas desde al año 2007 hasta el año 2018

**Tabla 3. Matrícula bruta estudiantil anual por sector laboral: público - privado y sexo. 2007 – 2018**

Total por sector // año	M	F	2007	M	F	2008	M	F	2009	M	F	2010
Inst. Públicas	21,416	23,242	44,658	22,368	23,977	46,345	23,525	25,029	48,554	24,435	25,736	50,171
Inst. Privadas	38,331	49,257	87,588	40,583	51,687	92,270	42,123	53,172	95,295	44,309	55,532	99,841
Total general	59,747	72,499	132,246	62,951	75,664	138,615	65,648	78,201	143,849	68,744	81,268	150,012
Total por sector // año	M	F	2011	M	F	2012	M	F	2013	M	F	2014
Inst. Públicas	26,562	27,592	54,154	27,456	27,444	54,900	27,820	27,961	55,781	27,017	27,356	54,373
Inst. Privadas	47,824	58,396	106,220	51,920	63,040	114,960	54,305	65,977	120,282	55,009	66,911	121,920
Total general	74,386	85,988	160,374	79,376	90,484	169,860	82,125	93,938	176,063	82,026	94,267	176,293
Total por sector // año	M	F	2015	M	F	2016	M	F	2017	M	F	2018
Inst. Públicas	26,872	27,425	54,297	26,867	27,018	53,885	28,856	28,725	57,581	29,521	29,764	59,285
Inst. Privadas	56,391	68,708	125,099	56,814	70,256	127,070	57,474	71,012	128,486	58,485	72,749	131,234
Total general	83,263	96,133	179,396	83,680	97,275	180,955	86,330	99,737	186,067	88,006	102,513	190,519

Fuente: Mazariego (2020). Elaboración propia con base a datos obtenidos a través del Sistema Nacional de Información y Estadísticas de Educación Superior (SNIEES) por Instituciones de Educación Superior públicas y privadas. [www.mined.gov.sv](http://www.mined.gov.sv)

**Figura 2.** *Matrícula bruta por sexo en la IES en El Salvador. 2007- 2018*

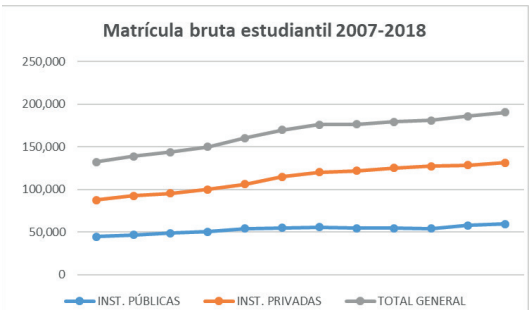


*Fuente:* Mazariego (2020). Elaboración propia a partir de los datos de la tabla.

Respecto de la proporción de estudiantes matriculados por sexo, excepto por dos años (2012 y 2017) donde el género masculino presentó un aumento leve de matrícula en relación con el femenino en las instituciones públicas, se puede afirmar que en el período de 2007 a 2018, las mujeres se matricularon consistentemente más que los hombres. Y en coherencia, para el año 2018 también las mujeres se graduaron más que los hombres. Del total de graduados (23,935 estudiantes) del nivel superior, el 44.52% hombres y 55.48% mujeres (MINED, 2018).

Unos científicos sociales ubican a El Salvador en la medianía de países de Latinoamérica que trabajan por la igualdad de género. Sin embargo, plantea que en América Latina «la segregación de género en la educación superior, en algunas disciplinas, reproduce y mantiene la desigualdad en el mercado laboral» (Papadópolos y Radakovich, 2006)

**Figura 3.** *Matrícula bruta estudiantil 2007-2018*



*Fuente:* Mazariego (2020). Elaboración propia a partir de los datos de la tabla.

La figura 3 muestra la tendencia en los últimos 12 años del comportamiento de la matrícula de estudiantes en la IES en El Salvador; puede verse un constante aumento tanto en instituciones públicas como privadas. Sin embargo, es importante notar que las instituciones públicas tienden al estancamiento en cuanto a las matrículas, los años 2007 y 2011 muestran el mayor porcentaje de matrícula 33.76% y el año más bajo fue 2016 con 29.77%; la tendencia muestra el estancamiento relativo de la matrícula en las IES públicas, al recibir menos del tercio de la población, el promedio de los doce años expuestos fue de 32%.

Las instituciones de educación superior aglutinadas como públicas son: la Universidad de El Salvador; cinco institutos tecnológicos especializados, a saber, 1. Escuela especializada de ingeniería ITCA-FEPADE, 2. Instituto especializado de nivel superior Escuela militar «Capital Gerardo Barrios», 3. Escuela superior franciscana especializada ESFE-AGAPE, 4. Instituto especializado de formación diplomática IESFORD, y 5. Instituto Especializado de Nivel Superior Academia Nacional de Seguridad Pública; tres institutos técnicos, 1. Escuela nacional de agricultura Roberto Quiñonez, 2. Instituto tecnológico de Chalatenango y 3. Instituto tecnológico de Usulután.

La matrícula total 2018 en IES públicas fue de 59,285 estudiantes matriculados, distribuidos en la universidad 50,348; en los institutos especializados 8,126 y en los institutos técnicos 811. Surge la duda, ¿Cuánto más podrían las IES públicas sostener el constante aumento de las matrículas estudiantiles?

### 3. Los posgrados

Aun cuando no aparece en la legislación nacional educativa la formación de posgrados; año con año, son reportados por parte del MINED, los datos estadísticos de «los posgrados», ingresos o graduaciones en las IES. Se expone a continuación la matrícula bruta total registrada en el 2018, para evidenciar su formación.

**Tabla 4.** *Matrícula Estudiantil de posgrado Académico, Tipo de Ingreso y Género. 2018*

Grado académico	Nuevo ingreso			Antiguo ingreso			Ingreso por equivalencia			Total general		
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total
Doctorado PG	4	2	6	37	20	57	0	0	0	41	22	63 (1.47%)
Especialidad MED.	74	77	151	124	140	264	0	0	0	198	217	415 (9.71%)
Maestría	399	431	830	1,499	1,461	2,960	1	1	2	1,899	1,893	3,792 (88.8%)
Nivel posgrado	477	510	987	1,660	1,621	3,281	1	1	2	2,138	2,132	4,270 (100%)

Fuente: Fragmento del cuadro N.º.60 de Información Estadística IES 2018. MI-NED.gob.sv

Los datos ponen de manifiesto algunos cambios respecto del comportamiento en los pregrados.

En el posgrado en general, no es tan marcada la diferencia por género como en el pregrado, si bien el nuevo ingreso muestra mayor matrícula de mujeres respecto de los hombres, en el antiguo ingreso se invierte el dato y son los hombres el mayor número de matriculados.

En el doctorado PG (de posgrado) el comportamiento por género está sustantivamente invertido, los hombres se matriculan en mayor medida. En la matrícula de nuevo ingreso el 66% son hombres y en el antiguo ingreso 65%; sobrepasando a las mujeres, con 33% y 35%, respectivamente. Son otras las variables intervinientes por género a nivel de estudios doctorales

Otro dato que destaca del cuadro es la baja oferta de Doctorados PG en comparación con los demás posgrados. Los doctorados PG representan solo el 1.47% del total de posgrados. Las maestrías son la principal formación de posgrado, las especialidades representan la segunda opción, y es privativa de los doctorados de grado.

## 4. Conclusiones

Las leyes vigentes o como pudiera llamarse «las reglas del juego» están ya establecidas en El Salvador. Hay aspectos fundamentales de las leyes que no están en coherencia con los cánones internacionales. También aspectos que más bien relegan a la «captación de registros» al órgano que debiera ser el fiscalizador y garante de la calidad en la formación superior, a ratos parecen reglas hechas para proveer a las instituciones de educación superior estabilidad productiva, seguridad institucional, antes que garantizar calidad en la formación de los estudiantes que atienden.

La legislación de la educación superior y los profesionales formados concurren a la satisfacción del mercado laboral, quedando muy pocas posibilidades de que la formación superior trascienda hacia la innovación y el desarrollo social; hasta que el mercado y la empresa alcancen algún desarrollo, los profesionales verán mejoras sociales junto a la población.

Es necesario normar los grados y posgrados académicos, en una consecución lógica, un prerrequisito de los otros, sin ambigüedades. Con énfasis en la formación de calidad dirigida a la innovación y el desarrollo social. Ordenar la formación de la educación superior es imprescindible para la internacionalización de las IES en la nación.

La Legislación nacional tendría que ponderar la investigación en todos los niveles en la educación superior, no solo tácitamente como ahora está consignado, por cuanto que aquellos aspectos que en una Ley están referidos tácitamente, se vuelven vacíos de Ley; sino que para cualquier IES tendría que ser exigencia de ley la formación en competencias investigativas y, según el nivel del grado en formación, distintos niveles de profundización en los temas investigados.

El sistema de acreditación del que gozan la IES resulta en un mecanismo fáctico para la captación clientelar de estudiantes y para tener garantizados amplios y expeditos márgenes de oferta de ca-

rreras, según las exigencias del mercado. La acreditación, además de lo que ya exige la Ley (por ejemplo: población estudiantil, computadora por estudiante, % docentes tiempo completo, estudiantes con computadora con internet) debiera ser un diploma de calidad académica científica de formación.

Las IES en El Salvador, en coherencia con su legislación conciben la formación como la creación de profesionales aptos para desenvolverse laboralmente, capacitados en el «saber hacer», con poco énfasis en las competencias investigativas. Y los «posgrados», que no figuran en la legislación nacional [en la UES sí], solo levemente enfatizan en la investigación, tímidamente en la innovación y desarrollo como metas formativas.

Para las IES públicas, particularmente la UES, tomando en cuenta los datos sobre las matrículas, la apuesta no deberá ser ampliar la cobertura puesto que, quizá ya se matriculan cantidades estudiantiles difíciles de manejar; la apuesta ha de ser a la calidad de la formación superior, la formación de competencias investigativas conducentes a la auto-superación y al desarrollo social.

La formación profesional en El Salvador, está dirigida a la formación de individuos competentes para ocupar puestos de trabajo, que, si bien satisface el mercado laboral, ata a la sociedad salvadoreña a ser un pueblo consumidor de conocimientos, sin la posibilidad de trascender y convertirse en una sociedad productora de conocimiento y desarrollo.

Es necesario hacer reformas legales para instaurar los posgrados en El Salvador. Vacíos legales, altos costos para fundar programas doctorales, falta de docentes aptos para impartir la formación, podrían explicar la desatención de las IES hacia la formación doctoral; habrá que investigar la demanda del mercado para los doctorados. «Las reformas llaman a la razón, pero no provocan pasión» comentaba (López Bernal, 2017) respecto de las reformas de nación. Sin embargo, para dar el salto cualitativo en la formación en educación superior, una nueva reforma es necesaria.



## Referencias

AGU. (27 de Agosto de 2010). Reglamento general del sistema de estudios de posgrado de la Universidad de El Salvador. *Acuerdo N.º 57/2009-2011 VII*. San Salvador: Asamblea general universitaria.

AUIP. (2002). Gestión de la calidad del posgrado en iberoamérica. Experiencias nacionales. Salamanca, España: Editorial AUIP.

AUPRIDES. (01 de Mayo de 2020). A los honorables Diputados de la Asamblea Legislativa. *La prensa gráfica*, pág. 43.

Ávalos Guevara, B. E. (28 de Junio de 2010). Análisis histórico del desarrollo académico de la Universidad de El Salvador. 1950-2003. *TESIS de Grado*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.

Ayala Mora, E. (2015). La investigación científica en las universidades ecuatorianas. *Anales. Revista de la universidades de Cuenca*, 61-72.

Badía Serra, E. (2000). Algunas reflexiones en torno a la educación superior en El Salvador. *Universidad y cambio de siglo*, 5-21.

Barsky, O., & Davila, M. (21 de Diciembre de 2009). *La evaluación de posgrados en la Argentina. Documento de trabajo*. Obtenido de Universidad de Belgrano: [http://www.ub.edu.ar/investigaciones/dt\\_nuevos/226\\_basky\\_davila.pdf](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/dt_nuevos/226_basky_davila.pdf)

Benavidez, M., Chavéz, C., & Arellano, A. (2016). La construcción política e institucional de la reforma universitaria: Los casos del Perú y Ecuador. En S. (. Cueto, *Innovación y calidad en educación en América Latina* (págs. 155- 194). Perú: GRADE.

Bourdieu, P. (2000). *Poder, derecho y clases sociales*. España: Desclée de Brouwer.

Castellón Murcia, R. A. (2010). Acreditación institucional en la educación superior. *Realidad y reflexión*, 39-48.

CONARES. (02 de Mayo de 2020). A los miembros de la honorable Asamblea Legislativa y la población salvadoreña. *La prensa gráfica*, pág. 35.

Crespin, O., & Cárdenas, G. (2013). El impacto potencial de las tesis de pre y posgrado. *Horizonte de la ciencia*, 55-60.

Crespo-Gascón, S., Tortosa, F. S., & Guerrero Casado, J. (2019). Producción de revistas científicas en américa latina y el caribe en scopus, journal citation reports y latindex en el área de los recursos naturales: su relación con variables económicas, ambientales y de inversión en investigación. *Revista española de documentación científica*.

Cuéllar-Marchelli, H. (2003). Decentralization and privatization of education in El Salvador: Assessing the experience. *International journal of edutational development*, 145-166.

Dávila, M. (2010). Tendencias internacionales en posgrados. Argentina: FLACSO.

du Gay, P. (2003). Organización de la identidad: gobierno empresarial y gestión pública. En S. Hall, & P. du Gay, *Cuestiones de identidad cultural* (págs. 251-280). Buenos Aires: Amorrortu.

Figueroa, H. (2020). Surgimiento y desarrollo del posgrado en la UES. 1977-2010.

Gálvez González, A. M., García Fariñas, A., & Portuondo Sánchez, C. (2011). Producción científica en la maestría de economía de la salud desde las perspectivas de las tesis. *Revista cubana de educación médica superior*, 389-397.

García, M. A. (1950). Diccionario histórico enciclopédico de la República de El Salvador. San Salvador: AHORA.

García, M. A. (1950). Diccionario histórico enciclopédico de la República de El Salvador. Tomo Segundo. En M. A. García, *Universidad nacional*. San Salvador: AHORA.

García, M. Á. (1956). Diccionario histórico enciclopédico de El Salvador. Tercer tomo. En M. Á. García, *Universidad nacional*. . San Salvador: AHORA.

Gómez Arévalo, A. P. (2010). Ideas y pensamientos educativos en América Latina: de la escolástica colonial al posneoliberalismo educativo. *RLEE*, 115-152.

Kenway, J. (1991). La educación y el discurso político de la nueva derecha. Enseñanza privada frente a enseñanza estatal. En S. J. Ball, *Foucault y la educación. Disciplinas y saber* (págs. 169-207). Madrid: Morata S. L.

Legislativa, A. (24 de Marzo de 1965). Ley de universidades privadas. San Salvador: Asamblea Legislativa.

Legislativa, A. (30 de Noviembre de 1995). Ley de Educación superior. San Salvador: Asamblea Legislativa.

Legislativa, A. (12 de Diciembre de 1996). Ley general de educación. *Ley general de educación*. San Salvador: Asamblea legislativa.

Legislativa, A. (14 de Octubre de 2004). Ley de educación superior. San Salvador: Asamblea legislativa.

Legislativa, A. (13 de Mayo de 2005). Ley general de educación. San Salvador: Asamblea legislativa.

Lindo Fuentes, H., & Ching, E. (2017). Modernización, autoritarismo y guerra fría. La reforma educativa fr 1968 en El Salvador. San Salvador: UCA editores.

López Bernal, C. G. (2017). De las reformas a la revolución postergada: la historia de El Salvador en el siglo XX. *Cuadernos Inter.c.a.mbio sobre Centroamérica y el Caribe*, 1-22.

Maher, D., & Cometto, G. (2016). La investigación sobre profesionales sanitarios comunitarios es necesaria para alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible. Suiza: Boletín de la Organización mundial de la salud.

MINED. (2000). Historia y reforma de la educación superior en El Salvador. San Salvador: Ministerio de Educación.

MINED. (28 de Mayo de 2009). Reglamento general de la ley de educación superior. San Salvador: Casa Presidencial.

MINED. (2016). Resultados de la información estadística de instituciones de educación superior 2016. San Salvador: Dirección nacional de educación superior.

MINED. (2018). Resultado de la información estadística de instituciones de educación superior 2018. San Salvador: Dirección nacional de Educación Superior.

MINED. (26 de Abril de 2020). *Comisión de acreditación de la calidad de la educación superior. El Salvador*. Obtenido de Ministerio de educación: <https://www.mined.gob.sv/cda/estadisticas.htm>

Ministros europeos de educación. (1999). Declaración de Bolonia. *Espacio europeo de enseñanza superior*. Bolonia.

Papadópulos, J., & Radakovich, R. (2006). Informe sobre la educación superior en América Latina y el Caribe. Venezuela: IE-SALC.

Picardo, J. (03 de Mayo de 1999). *Academia.edu*. Obtenido de [https://www.academia.edu/7759275/Reforma\\_educativa\\_ejm](https://www.academia.edu/7759275/Reforma_educativa_ejm)

Presidencia. (26 de Agosto de 1996). Reglamento general de la Ley de educación superior. San Salvador, El Salvador: Ministerio de educación.

Rama Vitale, C. (2007). *Los posgrados en América Latina y el Caribe en la sociedad del conocimiento*. México: Union de Universidades de América Latina y el Caribe.

Rodríguez Rivas, C. (2015). Rasgos ilustrados y no ilustrados del primer modelo de Universidad de El Salvador. *Centro Nacional de Investigaciones en Ciencias Sociales y Humanidades*, 83-117.

Ruiz R., M. A. (1999). La reforma de la educación en El Salvador. *Theoreticos*, 1-15.

Saavedra, M. G. (2006). Posgrados y demandas laborales: la evaluación de los profesionales. *Revista iberoamerica de educación*, 1-15.

Salomón, L., & Amador, J. (2013). Retos y desafíos de los posgrados en las universidades públicas del siglo XXI. *Ciencia y tecnología*, 3-14.

Saunders, R., Rivas, F., Rabossi, M., Ruiz, A. M., Avanzini, D., & Helwig, J. (2012). *El Salvador: Evaluación de la educación superior y recomendaciones*. San Salvador: UDAID.

Seas Tencio, J. (2017). Reflexiones sobre los desafíos del sistema de estudios de posgrado, en el marco de celebración del 40 aniversario de la UNED, y de cara a las exigencias sociales y educativas en la actualidad. *Espiga*, 40-51.

UNESCO. (2015). La nueva agenda educativa para América latina: los objetivos para el 2030. Incheon: Santillana.

Urbina Laza, O. (2015). La educación de posgrados en la Universidades médicas cubanas. *Educación médica superior*, 389-397.

Vargas, G. (2002). Hacia una teoría del capital social. *Revista de economía institucional*, 71-108.

## Perfil epidemiológico de la drogadicción en estudiantes universitarios

ISSN: 0104-1169

Carlos Alexander Ortega-Pérez<sup>1</sup>

Moacyr Lobo da Costa-Júnior<sup>2</sup>

Gabriela Pereira Vasters<sup>3</sup>

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=281421968002>

<sup>1</sup>Profesor Doctor, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador. E-mail: carlos.ortega@ues.edu.sv, carlosorsv@yahoo.com.

<sup>2</sup> Estadístico, Doctor en Salud Pública. Profesor Asociado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Centro Colaborador de la OMS para el Desarrollo de la Investigación en Enfermería, SP, Brasil. E-mail: mlobojr@eerp.usp.br.

<sup>3</sup> Estudiante de Doctorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Centro Colaborador de la OMS para el Desarrollo de la Investigación en Enfermería, SP, Brasil. E-mail: gabi\_vasters@yahoo.com.br.

Ortega-Pérez, Carlos Alexander; Lobo da Costa-Júnior, Moacyr; Pereira Vasters, Gabriela

Perfil epidemiológico de la drogadicción en estudiantes universitarios. Revista Latino-Americana de Enfermagem, vol. 19, junio, 2011, pp. 665-672 Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil.

Correspondencia:

Moacyr Lobo da Costa Jr.

Universidade de São Paulo. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto

Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas

Av. dos Bandeirantes, 3900

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14040-902 Ribeirão Preto, SP, Brasil

E-mail: mlobojr@eerp.usp.br

Es un estudio exploratorio con metodología cuantitativa. Los datos se obtuvieron mediante un cuestionario estructurado cerrado y autoadministrado a 500 estudiantes universitarios. El procesamiento y discusión de datos se hizo en base a frecuencias de ocurrencias del evento simples y estratificadas. 185 estudiantes (37,1 %) consumían o habían consumido drogas por lo menos alguna vez en la vida. La edad de inicio de consumo de su primera droga mostró que la mayoría la inicio entre 13 y 21 años. El alcohol fue la primera droga a ser utilizada, seguida por tabaco, marihuana, benzodicepinas y anfetaminas. La autopercepción del efecto de las drogas en los usuarios mostró una tendencia a negar que las drogas ejercían algún impacto sobre su propio rendimiento académico, evidenciándose entonces que no se percibe el consumo de drogas como un problema que los afecta si consumen droga, pero que si afecta a los demás cuando consumen drogas.

**Descriptores:** Consumidores de Drogas; Estudiantes; Drogas Ilícitas; Enfermería.

## **Perfil epidemiológico da toxicodependência em estudantes universitários**

Trata-se de estudo exploratório com metodologia quantitativa. Os dados foram obtidos por meio de questionário estruturado fechado e autoaplicável, com 500 estudantes universitários. O processamento e análise dos dados foram baseados em frequências simples e estratificadas. Dos estudantes, 185 (37,1%) consumiram ou tinham usado drogas pelo menos uma vez na vida. A idade da iniciação do consumo, sua primeira droga, começou entre 13 e 21 anos. O álcool foi a primeira droga utilizada, seguido pelos inalantes, depois maconha, benzodiazepínicos e anfetaminas. A respeito das percepções de autoefeito das drogas entre os usuários, esse grupo mostrou tendência a negar que as drogas exercessem algum impacto em seu desempenho acadêmico e, ainda, que o uso de drogas não é percebido como problema que afeta a si próprio, mas afeta apenas os outros colegas que as consomem.



**Descriptores:** Usuários de Drogas; Estudantes; Drogas Ilícitas, Enfermagem.

## **Epidemiological Profile of Drug Addiction in College Students**

Exploratory study with quantitative method. Data were obtained through a closed and structured questionnaire, self-administered to 500 undergraduates. Data processing and discussion was based on simple and stratified frequencies. In total, 185 (37.1%) students consumed or had used drugs at least once in life. Initial consumption started between the ages of 13 and 21 years. Alcohol is shown as the first drug, followed by snuff and, in descending order, marijuana, benzodiazepines and amphetamines. Regarding self-perception of the effect of drugs among users, this group showed a trend to deny that drugs exert some impact on their academic performance, showing that drugs use is not perceived as a problem if it affects only themselves, but is perceived as a problem if affecting fellow students when consuming drugs.

**Descriptors:** Drug Users; Students; Street Drugs; Nursing.

## **Introducción**

El uso de drogas en el ámbito mundial y en poblaciones de países con serios problemas socio políticos y económicos como El Salvador, constituye un problema que afecta a la sociedad en todas su complejidad, tanto estructural como funcional. Son afectados directamente como indirectamente el individuo, la familia y la sociedad, teniendo repercusiones de variable magnitud en las áreas económica, social, salud, educacional y afectivo, de los usuarios y de los que con ellos conviven a diario, eventualmente. La estimativa del costo humano, social y económico del problema de las drogas en todas sus manifestaciones constituye un proceso complejo que pasa por investigar la situación actual del perfil epidemiológico de la drogadicción como una necesidad para avanzar en el estudio y por el análisis y sistema-

tización de datos referidos a la problemática de las drogas en todas sus dimensiones. La necesidad de contar con información acerca de los niveles y características del consumo en ámbitos universitarios resulta imperiosa (1), por lo tanto una de las consecuencias del uso indebido de drogas entre los estudiantes universitarios se relacionó con una menor expectativa de vida de estos jóvenes (2). Sin duda, este estudio contribuirá con un valioso aporte para la comprensión y difusión de la problemática y especialmente se transformará en una herramienta valiosa para el diseño e implementación acciones orientadas a la prevención, detección y erradicación del consumo de sustancias que atentan contra las potencialidades individuales y colectivas de desarrollo.

## **Objetivo**

Explorar algunas características importantes del perfil epidemiológico de la drogadicción en la población estudiantil universitaria usuaria del bienestar universitario de la Universidad de El Salvador, mediante la investigación sobre el uso y tipo de drogas lícitas e ilícitas, algunos factores epidemiológicos y la percepción de los estudiantes usuarios de drogas sobre el impacto que el uso de estas drogas tiene sobre el rendimiento académico.

## **Material y Método**

El estudio es de tipo exploratorio con metodología de tipo cuantitativa. Los datos se obtuvieron mediante un cuestionario estructurado de modalidad cerrada autoadministrado aplicado a estudiantes usuarios del bienestar universitarios independientemente de la facultad o carrera a la que pertenecían. El cuestionario contenía preguntas cuyo objetivos eran abarcar los siguientes aspectos o dimensiones a explorar: lugar de procedencia; algunos aspectos sociodemográficos; presencia de consumo de drogas lícitas e ilícitas, edad de inicio de uso, así como también la percepción del impacto de este consumo de drogas en el rendimiento académico. El lugar

de estudio fue el Centro de Salud de Bienestar Universitario de la Universidad de El Salvador. El estimado del universo fue de 48.000 estudiantes universitarios, potenciales usuarios de Bienestar Universitario de la Universidad de EL Salvador. El grupo de la población se determinó a partir de todos los usuarios que se estimaba acudieron al bienestar universitario durante el mes de septiembre de 2008 de esta población; se eligió una muestra no probabilística con un muestreo aleatorio por voluntariado, con una meta por cuota de muestra mínima de 300 y una cuota de muestra máxima de 500.

Al final se logró suministrar 500 cuestionarios para lo cual fue necesario solicitar la colaboración voluntaria de 566 usuarios de los cuales 66 adujeron no tener tiempo o no estar interesados en colaborar, y los 500 restantes si aceptaron autoadministrarse el cuestionario con lo cual se logró la meta de 500, en el mes de Septiembre de 2008. Para la autorización y adecuación del instrumento se realizó una prueba piloto pidiendo a 10 estudiantes recién ingresados para que voluntariamente llenaran el cuestionario, sin la intervención de los investigadores, luego de lo cual se les dio la oportunidad de criticar y observar el instrumento respecto a si algunos de los ítems les generaba alguna confusión o si sentían que el instrumento violentaba su integridad tanto moral como psicológica, a lo cual los 10 estudiantes respondieron que el instrumento no violentaba su integridad tanto moral como psicológica. Posteriormente se procedió a hacer los ajustes necesarios al cuestionario de acuerdo a las observaciones obtenidas durante este procedimiento.

Debido a que el comité de ética de investigación aún está en formación dentro de la universidad y que ninguna entidad externa al universidad puede autorizar la realización de procesos dentro de ésta ya que violaría la autonomía universitaria, el cuestionario que se suministró a los estudiantes fue aprobado para que fuera aplicado en las instalaciones del Centro de Salud Universitario de Bienestar Universitario, dicha autorización fue emitida por la Secretaria de Bienestar Universitario de La Universidad de El Salvador.

El instrumento de recolección de datos se aplicó a los estudiantes que por cualquier motivo asistieron al Bienestar Universitario o al Centro de Salud Universitario que también forma parte de Bienestar Universitario realizando la selección de la muestra de forma

aleatoria, pero tomando en cuenta de que ella fuese representativa de todos los años de estudio, es decir desde el universitario recién ingresado hasta los que cursaban los últimos años de las carreras. El trabajo de campo se realizó en el Campus Central de La Universidad de El Salvador en el Bienestar Universitario y su Centro de Salud Universitario; el estudio fue coordinado por el titular de la presente investigación. El desarrollo de la investigación implicó la capacitación de estudiantes de último año de Educación para la salud para suministrar el cuestionario a la población estudiantil en estudio.

Se les explicó verbalmente y por escrito los objetivos y el uso que se le daría a la información obtenida mediante el cuestionario. Además se les explicó que una vez que accedieron a llenar el cuestionario, éste estaba diseñado para que por ningún motivo se pudiese determinar la identidad de la persona que lo llenó y que el consentimiento sólo sería verbal para que no quede evidencia escrita sobre la posible identidad, una vez obtenido el consentimiento verbal el estudiante pasaba a un cubículo que se destinó para poder llenar por escrito y de manera confidencial el cuestionario, luego de lo cual el estudiante lo depositaba en un contenedor para los cuestionarios el cual era abierto al final del día.

Las variables que se evaluaron en la investigación fueron: edad, sexo, nivel de carrera universitaria, afirmación o negación del consumo de drogas, tipo de droga consumida, frecuencia de droga consumida, motivos que llevaron al consumo de drogas y percepción del impacto del consumo de drogas en el rendimiento académico. Se realizó el cruce de las siguientes variables: patrones de consumo asociados a determinadas drogas, relacionándolo con los perfiles sociodemográfico, presencia de consumo y tipo de droga consumida de acuerdo con los perfiles socio demográficos, percepción del efecto del consumo de drogas sobre su propio rendimiento académico o el efecto del consumo de drogas en sus compañeros que consumen drogas, estas últimas variables también se evaluaron a la luz de la edad del estudiante que contestó ese ítem. Una vez que se obtuvieron los datos, estos fueron procesados en Excel y analizados con el programa Epi-info, utilizando tablas con frecuencias de ocurrencia del evento simples y estratificadas. Quizá cabe señalar que se tuvieron tanto facilidades como dificultades en la investiga-

ción; se tuvo el acceso a los estudiantes para tener la muestra más óptima, se tuvo la logística y los recursos humanos; se encontraron problemas de restricciones en lo que respecta al recurso económico, pero quizá la dificultad mayor que se tuvo fue superar el estigma y el miedo de los estudiantes a la hora de responder a las interrogantes del cuestionario.

## Resultados

De la población en estudio 392 estudiantes tenían entre 18 y 23 años; estando la mayoría (70) ubicada en el intervalo de 24 a 26 años, 11 tenían 17 años o menos y 27 tenían 27 años o más, de esta población 293 (58,6%) fueron de sexo femenino y 207 (41,4%) de sexo masculino; cuando a esta población se le preguntó si consumían o habían consumido drogas por lo menos alguna vez en la vida, 185 (37,1%) respondieron que sí y 313 (62,9%) respondieron que no, de los que respondieron que sí a la pregunta, 152 fueron de origen urbano y 33 fueron de origen rural, 82 de sexo femenino y 103 masculinos. La edad de inicio de consumo de su primera droga mostró que 3 habían consumido antes de los 12 años, 71 entre los 13 y 15 años, 79 entre los 16 y 18 años, 28 entre 19 y 21 años, 5 entre 22 y 24 años, 2 después de los 25 años, sobre el motivo que los indujo a consumir droga por primera vez 82 respondieron que por curiosidad, 36 por influencia de amistades, 20 por estar en una fiesta, 13 porque simplemente les dio ganas de consumirla, 8 por ansiedad o porque querían relajarse, 5 por motivos sociales, 5 por diversión, 3 por tensión académica, 4 por problemas familiares, 1 por depresión, 2 por problemas económicos y 6 respondieron que fueron diversos los motivos que los indujeron a consumir drogas por primera vez (Tabla 1).

**Tabla 1.** *Los motivos del primer consumo de drogas*

Motivos	# de sujetos	%
Curiosidad	82	44,3
Influencia de amistades	36	19,5
Por alguna celebración o fiesta	20	10,8
Simplemente por tener ganas	13	7
Por ansiedad/ relajarse	8	4,3
Diversos motivos	6	3,2
Diversión	5	2,7
Motivo social	5	2,7
Tensión Académica	3	1,6
Problemas familiares	4	2,1
Depresión	1	0,5
Problemas económicos	2	1,0
Total	185	100%

En cuanto a la edad de inicio de consumo respecto al sexo sólo 1 persona de sexo femenino y 2 de sexo masculino consumieron entre los 8 y 12 años, 30 persona de sexo femenino y 41 de sexo masculino consumieron entre los 13 y 15 años, 30 personas de sexo femenino y 49 de sexo masculino consumieron entre los 16 y 18 años, 15 persona de sexo femenino y 13 de sexo masculino consumieron entre los 18 y 21 años, sólo 5 personas de sexo femenino consumieron entre 22 y 24 años y sólo 2 personas de sexo femenino entre 25 y 28 años (Tabla 2).

**Tabla 2.** *Edad de inicio según frecuencia de edad en años*

Edad	Sexo	
	Femenino	Masculino
08	1	0
12	0	2
13	4	5
14	11	19
15	15	17
16	8	15
17	11	14
18	11	20
19	8	8
20	3	3
21	4	2
22	2	0
23	2	0
24	1	0
26	2	0
Total		105

Se puede observar que 193 consumieron al menos una droga inicialmente, luego de esos 193 fueron 98 los que consumieron una segunda droga, luego 28 consumieron una tercera droga, 5 una cuarta droga y 1 persona llegó a consumir una quinta droga. El alcohol se muestra como la primera droga a ser utilizada, el tabaco la segunda, siguiendo en orden descendente la marihuana, benzodiacepinas y anfetaminas. La segunda droga en ser utilizada como inicio en orden fue el tabaco, seguido en orden descendente por el alcohol, cocaína, crack, otros tranquilizantes y sedantes, marihuana y otros estimulantes. La tercera en ser consumida como inicio fue la marihuana, tabaco, cocaína, crack, otros tranquilizantes y sedantes y anfetaminas. La cuarta droga consumida fue la marihuana seguida en orden descendente por LSD y una persona que consumió hachís. La 5ª droga consumida como inicio fue la cocaína por una persona.

En el grupo en el que alcohol se muestra como la primera droga en ser utilizada como iniciación, se encontraron 68 usuarios del sexo femenino, 76 usuario masculinos; en este mismo grupo el tabaco fue la segunda en ser utilizada con 10 usuarias femenina y 22 usuarios

masculinos, siguiendo en orden descendente la marihuana 5 usuarios femeninos y 9 masculinos, benzodiacepinas 1 usuario femenino y 1 usuario sexo masculino y anfetaminas un usuario masculino. En el grupo en que la segunda droga en ser utilizada como iniciación fue el tabaco, mostró 31 usuarios tanto femenino como masculino, seguido en orden descendente por el alcohol, 3 usuarias de sexo femenino y 13 masculino, cocaína 2 usuarios tanto femenino como masculinos, crack sólo dos usuarios de sexo masculino, otros tranquilizantes y sedantes 2 usuarios de sexo femenino, marihuana 1 usuario sexo masculino y otros estimulantes sólo un usuario masculino. En el grupo en que la tercera en ser consumida como iniciación fue la marihuana, se encontró 7 usuarios de sexo femenino y 6 de masculino, tabaco 4 usuarios de sexo femenino, crack 2 usuarios de sexo masculino, otros tranquilizantes y sedantes 2 usuarios de sexo femenino y anfetaminas 1 usuario de sexo masculino. En el grupo en que la cuarta droga consumida como iniciación fue la marihuana, se encontraron 2 usuarios de sexo masculino, seguida en orden descendente por LSD 1 usuario de sexo masculino y una persona también de sexo masculino que consumió hachís. En el grupo en que la quinta droga consumida como iniciación fue la cocaína, se encontró una persona de sexo masculino (Tabla 3).



Tabla 3. Tipo y orden de uso de droga consumida

Nombre de la droga	Tipo y orden de uso de droga consumida											
	1a consumida		2a consumida		3a consumida		4a consumida		5a consumida			
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
Alcohol	144	74,6	16	18,2		-		-		-		-
Anfetamina	1	0,5		-	1	3,6		-		-		-
Benzodiacepinas	2	1,0		-		-		-		-		-
Marihuana	14	7,3	1	1,1	13	46,4	2	40,0		-		-
Tabaco	32	16,6	62	70,5	8	28,6		-		-		-
Cocaína	-		4	4,6	2	7,1		-	1	100		-
Crack	-		2	2,3	2	7,1		-		-		-
Otros, tranquilizantes y sedantes	-		2	2,3	2	7,1		-		-		-
Otros estimulantes	-		1	1,1		-		-		-		-
Hachís	-			-		-	1	20,0		-		-
LSD	-			-		-	2	40,0		-		-
# de consumidores	-		88		28		5		1			-

La percepción del efecto de las drogas por los usuarios sobre su propio rendimiento académico fue de 110 usuarios de drogas que manifestaron que no hay ningún impacto de las drogas en su rendimiento académico, 51 manifestaron que es poco el impacto, 19 que si le afecta de manera importante y 10 manifestaron que le ha llevado a reprobar materias, ningún usuario manifestó haberse retirado de los estudios por causa de las drogas. De los usuarios de drogas que manifestaron que no hay ningún impacto de las drogas en su rendimiento académico, 7 tenían edad entre 16 y 18 años, 49 entre 19 y 21, 34 entre 22 y 24, 20 entre 25 y 28, de los que manifestaron que es poco el impacto, 6 usuarios tenían entre 16 y 18, 22 entre 19 y 21, 17 entre 22 y 24, 3 entre 25 y 28 y sólo 3 tenían 29 o más años. De los que manifestaron que si les afectaba de manera importante, 2 usuarios tenían entre 16 y 18, 8 entre 19 y 21, 3 entre 22 y 24, 3 entre 25 y 28 y sólo 3 tenían 29 o más años; y de los que manifestaron que les ha llevado a reprobar materias, 7 tenían entre 19 y 21 años, 2 entre 22 y 24, 1 entre 25 y 28. Al darles la oportunidad de opinar sobre el efecto de las drogas en sus compañeros, este grupo cambia su opinión ya que 123 opinaron que las drogas les afecta de manera importante, les ha llevado a reprobar materias y que los compañeros se han retirado de los estudio debido al consumo de drogas y sólo 61 es de opinión que las drogas no ejercen ningún impacto o si lo hacen es poco impacto.

La percepción de los estudiantes en general, independientemente de ser usuario de drogas, sobre el efecto de las drogas en el rendimiento académico de sus compañeros de estudio usuarios de drogas fue: 19 manifestaron que no hay ningún impacto de las drogas en el rendimiento académico, 85 manifestaron que es poco el impacto, 180 que si les afecta de manera importante, 155 manifestaron que les ha llevado a reprobar materias y 58 manifestaron que les ha llevado a retirarse de los estudios a causa de las drogas. De los que manifestaron que no hay ningún impacto de las drogas en el rendimiento académico, 1 tenían edad entre 16 y 18 años, 2 entre 19 y 21, 9 entre 22 y 24, 7 entre 25 y 28, de los que manifestaron que es poco el impacto, 3 tenían entre 16 y 18, 42 entre 19 y 21, 34 entre 22 y 24, 5 entre 25 y 28 y sólo 1 tenía 29 o más años. De los que manifestaron que si les afecta de manera importante, 22 usuarios tenían entre 16 y

18, 65 entre 19 y 21, 71 entre 22 y 24, 12 entre 25 y 28 y sólo 10 tenía 29 o más años, y de los que manifestaron que les ha llevado a reprobar materias, 18 tenían entre 16 y 18 años, 66 entre 19 y 21, 48 entre 22 y 24, 21 entre 25 y 28, y sólo 2 tenía 29 o más años. Por último está el grupo de los que manifestaron que las drogas han llevado a compañeros usuarios de drogas a retirarse de los estudios, estando 9 entre 16 y 18 años, 27 entre 19 y 21, 15 entre 22 y 24, 4 entre 25 y 28, y 3 tenía 29 años o más.

## Discusión

Inicialmente hay que considerar que los resultados obtenidos de manera sustancial muestran un comportamiento similar los resultados obtenidos en otros estudios similares realizados en El Salvador(3-5) y otros estudios importantes en el ámbito internacional(6-8).

Otro aspecto importante de citar en los resultados es que el comportamiento del usuario de droga fue similar entre los grupos de origen urbano (36.6 %) y rural (39.8 %), sin comprometer los resultados, este comportamiento probablemente se debe a que ambos grupos están expuestos al ambiente común universitario; habría que profundizar más en este aspecto en futuras investigaciones. Se observó una clara predisposición del sexo masculino al uso de drogas, con un 50,2 % en contraposición con un 28 % en el sexo femenino, destacamos que lo anterior sucede a pesar que de la población femenina en la muestra fue considerablemente mayor (58,6 %).

Respecto a la edad de inicio del consumo de drogas, esta es iniciada a temprana edad, incluso en el estudio se observa que 1,5 % inicio entre los 8 y 12 años y ya en edades entre los 13 y 18 el 79,8 % ya consumía o había consumido droga por lo menos una vez en la vida, ya a los 21 años, el 94,7 % ya consumía o habían consumido droga por lo menos una vez en la vida.

La edad de ingreso de los jóvenes a la Universidad ronda entre los 17 y 18 años, así al menos el 50 % o más de los jóvenes usuarios de drogas ya había consumido al menos una droga antes de su ingreso a la universidad este resultado es similar al comportamiento observado en otro estudio(7).

Respecto al sexo y la edad de inicio de consumo, los grupos femeninos y masculinos se comportan de manera similar, sin embargo es importante resaltar que el 8,4 % de las mujeres esperaron llegar a edades entre 22 y 28 años para iniciar el uso de drogas en contraposición con el sexo masculino, en los cuales el 100 % inicio antes de los 21 años.

Los motivos que inducen al consumo de drogas son variados, de manera similar que en otros estudios (4,9) la curiosidad se mostró como uno de los aspecto importantes que inducen a los jóvenes al uso de drogas, incluida la curiosidad se infiere que el 78,9 % consumió drogas por motivos casi exclusivamente socioculturales, como la curiosidad, por diversión, fiestas, por influencia de amistades, pertenencia a grupos sociales, sin embargo es preocupante la presencia de algunos problemas psicológicos o sociales como ansiedad, tensión académica, problemas familiares, depresión y problemas económicos, que ya a tempranas edades se muestran como motivos para el uso de drogas.

Con respecto al tipo de droga los resultados fueron similares a los obtenidos en los estudios citados anteriormente (3-7), acá se observa que al igual que en la mayoría de países donde se estudia el fenómeno de las drogas, el alcohol (74,6 %) y el tabaco (16,6 %) son las primeras y principales drogas de inicio de uso, seguidas por la marihuana con 7,3 %, benzodiacepinas 1 % y anfetaminas 0,5 %.

Cuando los usuarios de una primera droga deciden experimentar con una segunda droga el tabaco (70,5 %) es la principal droga utilizada y siendo el alcohol la primera droga en ser utilizada, se puede inferir que los usuarios iniciales de alcohol en un buen porcentaje deciden como segunda droga el tabaco, y del grupo que utilizan el tabaco como primera droga (de inicio) su segunda droga utilizada es el alcohol, con un 18,2 %, la cocaína 4,6 %, crack 2,3 %, otros tranquilizantes y sedantes 2,3 %, marihuana y otros estimulantes un 1,1 % cada una. Se observó que al utilizar una segunda droga los jóvenes inician el uso de drogas ilícitas distintas a la marihuana y ya salen a la luz drogas como cocaína y crack.

En el grupo que utiliza una tercera droga hay un porcentaje muy importante que usa la marihuana (46,4 %), continua el uso de cocaína y crack con un 7,1 %, otros tranquilizantes y sedantes con 7,1 %. Respecto al sexo, de los 193 usuarios de drogas, el alcohol se muestra como la primera droga a ser utilizada con 80,9 por

usuarios del sexo femenino y 70 % usuarios masculinos, el tabaco la segunda en ser utilizada con 11,9 % usuarias femeninas y 20,2 % usuarios masculinos, siendo más clara la preferencia por parte del sexo femenino, siguiendo en orden descendente, la marihuana 5,9 % usuario del sexo femenino y 8,3 % del sexo masculino, benzodiazepinas 1,2 % usuario del sexo femenino y 0,9 % usuario del sexo masculino y anfetaminas 0,9 % usuario del sexo masculino; cómo podemos observar la conducta es similar en ambos sexos respecto al uso de la primera droga, sin embargo hay que señalar que una persona del sexo masculino, en su primer uso de droga, utilizó una droga ilícita como la anfetamina. De los 88 usuarios que decidieron usar una segunda droga, el comportamiento respecto al sexo demuestra que hay una tendencia significativamente mayor entre las mujeres con 81,6 % a preferir el tabaco, siendo en los hombres 62 %; en contraposición con respecto al alcohol sólo el 7,9 % fueron usuarias del sexo femenino y 26 % del sexo masculino, en el resto de los casos se observa una influencia relevante al momento de opinar sobre el efecto de las drogas sobre el rendimiento académico de los consumidores. No es así con el hecho de ser o haber sido usuario de drogas, que sí impacta de manera importante al momento de decidir por una segunda droga, el comportamiento observado es similar en ambos sexos respecto a la cocaína 5,3 % usuarios del sexo femenino y 4 % masculinos, crack sólo 4 % usuarios del sexo masculino, otros tranquilizantes y sedantes 5,3 % usuarios del sexo femenino, marihuana 2% usuario del sexo masculino y otros estimulantes sólo 2 % usuario del sexo masculino. Es importante destacar que ninguna mujer usó una cuarta o quinta droga en contraposición a los hombres, donde 5 consumieron una cuarta droga y uno consumió una quinta droga.

Al observar la edad tanto en consumidores como no consumidores no se observa una influencia relevante al momento de opinar sobre el efecto de las drogas sobre el rendimiento académico de los consumidores. No es así en lo que se refiere a ser o haber sido usuario de drogas, que sí impacta de manera importante al momento de opinar sobre el efecto de las drogas, observándose una tendencia a negar el hecho de ser afectados por el consumo de drogas, los que son usuarios muestran una tendencia marcada a negar que las

drogas ejercen algún impacto sobre su propio rendimiento académico “a mí cuando consumo drogas estas no me afectan mi rendimiento académico”, pero a los compañeros de los usuarios de drogas si les afecta el consumo de drogas en su rendimiento académico, de manera marcada no se evidencia que por parte de los usuarios de drogas exista una aceptación de que el consumo de drogas es un problema para sí mismos y para su desarrollo individual.

## **Consideraciones finales**

El perfil del usuario, el tipo de droga, la edad de inicio, la relación de las anteriores variables con el sexo, se comportan en gran medida de manera similar a otros estudios, tanto locales como regionales. La frecuencia del consumo o haber consumido drogas, es similar tanto en el ámbito rural como en el urbano. A pesar de tener orígenes diferentes, en este momento tienen la influencia del ámbito universitario, pero habría que profundizar más en este aspecto en futuras investigaciones. También, es importante el hallazgo de que, por lo menos, 50 % o más de los jóvenes usuarios de drogas ya habían consumido al menos una droga antes de su ingreso a la universidad.

Hay una clara mayor predisposición del sexo masculino al uso de drogas; iniciado el uso de drogas ambos sexos se comportan en gran medida de manera similar, sin embargo un pequeño porcentaje de mujeres aún espera llegar a edades mayores para el inicio de uso de drogas. Además, los hombres, diferentemente de las mujeres, demostraron una tendencia a experimentar con una cuarta y quinta droga; sin embargo esto ameritaría un estudio más exhaustivo en este aspecto en particular. Respecto a la percepción del efecto de las drogas sobre el rendimiento académico, se observa poca incidencia de la edad al momento de opinar, no así el hecho de ser o haber sido usuario de drogas, que si impacta de manera importante al momento de opinar sobre el efecto de las drogas, de tal forma que, los que son usuarios muestra una tendencia a negar que las drogas ejercen algún impacto sobre su propio rendimiento académico, no así cuando se trata de opinar sobre este impacto en el rendimiento académico de compañeros usuarios de drogas, en donde si opina que si les afecta

concluyendo, entonces que no se acepta el problema de las droga como un problema que le afecta si consume droga, pero que si afecta a los demás cuando consumen drogas. Con los resultados obtenidos en este estudio exploratorio se obtiene una información muy importante para dar continuidad a la investigación sobre el fenómeno de la drogadicción en estudiantes universitarios.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas/CICAD de la Secretaria de Seguridad Multidimensional/SSM de la Organización de los Estados Americanos/OEA, la Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas/SENAD do Gabinete de Seguridad Institucional/Brasil, la Escuela de Enfermería de Ribeirao Preto de la Universidad de Sao Paulo y Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud para el Desarrollo de la Investigación en Enfermería, la población representada en los estudios de investigación, bien como a las autoridades de las universidades representadas por los participantes del Programa En-Line de Especialización en Investigación sobre el Fenómeno de las Drogas, periodos 2006, 2007, 2008 y 2009.

## Referencias

1. Henriquéz PC, Carvalho AMP. Percepção dos beneficios do consumo de drogas e das barreiras para seu abandono entre estudantes da área da saúde. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2008; 16 (spe):621-6.
2. Murphy, JG, McDevitt-Murphy ME, Barnett NP. Drink and be merry? Gender, life satisfaction, and alcohol consumption among college students. Psychol Addict Behav. 2005; 19(2):184-91.
3. Fundación Antidrogas de El Salvador – FUNDASALVA [internet] Prevalencia del Consumo de Sustancias Psicoactivas en El

Salvador; 2004. [acceso 8 feb 2010]. Disponible en: [www.fundasalva.org.sv/home](http://www.fundasalva.org.sv/home)

4. Rivas I. Factores que incidieron en el consumo de drogas lícitas e ilícitas. *Rev Cient CREA CIENCIA*. 1997;(6):7-11.
5. Gloria Bodnar, Karla Rodriguez, Aradenia Guevara, Margarita Montoya. Observatorio Salvadoreño sobre Drogas “Presencia de Alcohol y otras SPA en salas de Emergencia de Hospitales Generales en San Salvador” Junio 2004. Departamento de Investigación y Evaluación; Fundación Antidrogas de El Salvador FUNDASALVA. [acceso en 08 feb 2010]. Disponible en: [www.fundasalva.org.sv](http://www.fundasalva.org.sv)
6. Gonzalez GB, Cedeao MA, Penna M, Caris L, Delva J, Anthony JC. Estimated occurrence of tobacco, alcohol, and other drug use among 12- to 18-year-old students in Panama: results of Panama's 1996 National Youth Survey on Alcohol and Drug Use. *Rev Panam Salud Publica*. 1999;5(1):9-16.
7. Dormitzer CM, Gonzalez GB, Penna M, Bejarano J, Obando P, Sanchez M et al. The PACARDO research project: youthful drug involvement in Central America and the Dominican Republic. *Rev Panam Salud Publica*. 2004; 15(6):400-16.
8. Chavez KAP, O'Brien B, Pillon SC. Uso de drogas e comportamentos de risco no contexto de uma comunidade universitária. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2005; 13(spe2):1194-200.
9. Tavares BF, Beria JU, Lima MS. Fatores associados ao uso de drogas entre adolescentes escolares. *Rev Saúde Pública*. 2004; 38(6):787-96.



# Capítulo 5. Factores de riesgo cardiovascular



# Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, síndrome metabólico e hiperuricemia en personal docente y administrativo de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador en el año 2018

Rafael Antonio Orellana-Cornejo\*

María Virginia Rodríguez-Funes

Unidad de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador

\*Rafael Antonio Orellana-Cornejo E-mail: raoc707@hotmail.com

DOI: 10.24875/ALAD.19000383

## Resumen

La enfermedad cardiovascular es un problema mundial de salud pública. Se han identificado los llamados factores de riesgo cardiovascular (FRCV), así como los componentes del denominado «síndrome metabólico» (SMet). La importancia de su tamizaje en la población adulta es su capacidad de ser modificables mediante intervenciones sanitarias. El objetivo del presente estudio es el de cuantificar la prevalencia de los FRCV, del síndrome metabólico y la hiperuricemia en el personal de la Facultad de Medicina. Pacientes y métodos: Usando un diseño transversal de prevalencia, se invitó a todo el personal a participar, midiendo los criterios para: FRCV, SMet e hiperuricemia. Resultados: Hubo 207 participantes: 108 del sexo femenino y 99 del sexo masculino. El FRCV más común fue obesidad (sumando sobrepeso) con 81.8 %, seguido por niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad con 56.45 %. La prevalencia de SMet por el Panel de tratamiento del adulto III (ATP III) del Colegio Americano de Endocrinología fue del 28.8 % y por Declaración Conjunta Interina (JIS) de la Federación Internacional de Diabetes del 34.78 %. Hubo una variación de las prevalencias para el sexo masculino dependiendo de la definición, con ATP III (26.26 %) y con JIS (38.38 %) dependiente del corte de la circunferencia de la cintura, comparado con prevalencias iguales en ambas definiciones (31.48 %) para el sexo femenino. La prevalencia de hiperuricemia fue del 4.8 %.

**Conclusiones:** La prevalencia de FRCV y SMet son altas en la población trabajadora de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, con predominancia en el personal administrativo y en el sexo masculino.

**Palabras clave:** Prevalencia. Síndrome metabólico. Factores de riesgo cardiovascular. Obesidad. Hiperuricemia. Profesionales de salud.

## Abstract

Cardiovascular disease is a worldwide public health problem. Cardiovascular risk factors (CVRF) have been identified, which may appear isolated, or combined in the definition of “metabolic syndrome” (MetS). The importance of its screening in the adult population is their susceptibility of being modified through health interventions. The aim of this research is to quantify the prevalence of CVDS, MetS and hyperuricemia in the Faculty of Medicine staff. Patients and methods: Cross sectional design for prevalence, inviting all staff to participate, measuring criteria for: CVRF, MetS and hyperuricemia. Results: There were 207 participants: 108 female and 99 males. The most common CVRF was obesity (adding overweight) with 81.8 %, and low High Density Lipoproteins (HDL) levels with 56.45 %. Prevalence of MetS by Adult Treatment Panel (ATP) III was 28.8 % and by JIS 34.78 %. There was a variation of prevalence for men with ATP III (26.26 %) and JIS (38.38 %) dependent on the cutoff point of waist circumference, compared with equal prevalence for women with both definitions (31.48 %). Prevalence for hyperuricemia was 4.8 %.

**Conclusions:** The prevalence of CVRF and MetS are high in the staff population of the Faculty of Medicine University of El Salvador, with a predominance in administrative staff and men.

**Key words:** Prevalence. Metabolic syndrome. Cardiovascular risk factors. Obesity. Hyperuricemia. Health professionals.

## Introducción

La enfermedad cardiovascular (ECV) es un problema mundial de salud pública por su alta tasa de mortalidad<sup>1</sup>. Para dicha enfermedad se han identificado factores de riesgo, conocidos como factores de riesgo cardiovascular (FRCV). Estos factores pueden estar presentes de forma aislada y también combinados<sup>2</sup> conformando el denominado síndrome metabólico (SMet). El Estudio Framingham del Corazón fue el primer gran estudio de cohortes que se realizó con el objetivo «de estudiar la expresión de la enfermedad arterial coronaria en una población “normal” y de determinar los factores predisponentes a su desarrollo con un seguimiento a largo plazo...»<sup>3</sup>, identificando los siguientes factores: ser del sexo masculino, hipertensión arterial tratada o no tratada, colesterol sérico (total y lipoproteínas de alta densidad [HDL]), peso corporal relativo, hematocrito, fumar de cigarrillos y hallazgos electrocardiográficos<sup>3-6</sup>. Estos factores fueron analizados basados en riesgos poblacionales y no individuales, y cada uno de ellos tiene su propio riesgo. También han sido validados en su capacidad predictiva para todos los seres humanos, independiente de la raza, aunque la fuerza de la asociación difiera<sup>4</sup>. La importancia de conocerlos y tamizarlos en la población es su susceptibilidad de ser modificados con intervención<sup>7</sup>. Para su uso en la práctica clínica y para efectos de investigación, estos factores han sido articulados generando sistemas de puntuación clínicos predictivos de riesgo<sup>3</sup> que son recomendados en las guías internacionales de diabetes<sup>8-10</sup>.

La definición de obesidad también ha evolucionado, estableciendo como mejor parámetro la circunferencia abdominal, para la cual en Latinoamérica se han validado los valores corte de  $\geq 94$  cm para varones y  $\geq 92$  cm para mujeres<sup>11</sup>.

El SMet se define como «un conjunto de factores interconectados que aumenta de forma directa el riesgo de enfermedad coronaria, otras formas de ECV arterioesclerótica y diabetes mellitus»<sup>12-14</sup>. Sus componentes principales son: a) dislipidemia (valores elevados de triglicéridos, valores elevados de las lipoproteínas que contienen

la apolipoproteína B y valores disminuidos de HDL); b) elevación de la presión arterial; c) desregulación de la homeostasis de la glucosa, y d) obesidad abdominal y/o resistencia a la insulina (RI)<sup>13</sup>. Las definiciones propuestas para SMet son: de la Organización Mundial de la Salud (OMS), del Grupo Europeo de Estudio de la Resistencia a la Insulina, del Programa Nacional de Educación para el Colesterol, del Panel de tratamiento del adulto (ATP) III del Colegio Americano de Endocrinología, de la Federación Internacional de Diabetes (IDF)<sup>15</sup>, definiciones que fueron armonizadas en la Declaración Conjunta Interina (JIS) de la IDF<sup>14</sup>.

El SMet está relacionado con: el desarrollo de diabetes tipo 2, hasta 5 veces más<sup>16</sup>, duplica el riesgo de desarrollar ECV, incluido infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular y muerte por ECV<sup>2,17</sup>. Esto independiente a la presencia o no de diabetes mellitus<sup>2,18</sup>, y el riesgo de mortalidad por todas las causas en 1.58 veces más<sup>2</sup>. También tiene impacto en el desarrollo de la enfermedad esteatósica del hígado, y en complicaciones posquirúrgicas en diferentes tipos de cirugía<sup>19</sup>.

La hiperuricemia es otro factor de riesgo CV, ya que se le ha demostrado relación con el desarrollo y progresión de la hipertensión arterial, accidente cerebrovascular y ECV hasta 2.32 veces más que los que no tienen hiperuricemia<sup>20-22</sup>.

Las prevalencias mundiales reportadas de SMet oscilan desde < 10 % en Corea del Sur, hasta casi el 40 % en hombres en EE.UU.<sup>23</sup>. En la región se tienen como valores de prevalencia el 25.3 % para mujeres y el 23.2 % en hombres, y el grupo etario con la más alta prevalencia consistió en aquellos con más de 50 años de edad<sup>24</sup>. Los componentes aislados más frecuentes de SMet fueron niveles de colesterol HDL bajos (62.9 %) y obesidad abdominal (45.8 %)<sup>25</sup>. En El Salvador las prevalencias reportadas en estudios previos son: para definición ATP III del 22.68 % y para definición IDF del 30.58 %<sup>26</sup>. Y las prevalencias para cada uno de los criterios aislados son: hiperglucemia (glucemia  $\geq 100$  mg/dl) 12 %, diabetes mellitus 6.81 %, hipertrigliceridemia (triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl) 75 %, disminución del

colesterol HDL (menos de 40 mg/dl en hombres y menos de 50 mg/dl en mujeres) 96 %, hipertensión (presión arterial [PA]  $\geq$  130/85 mmHg o hipertensión previa) 62.12 % y aumento de la circunferencia abdominal (hombres 102 cm, mujeres 88 cm) 67.42 %<sup>26</sup>.

Reportes de prevalencia de SMet en trabajadores de salud muestran cifras diferentes y en ocasiones más altas<sup>27,28</sup>.

El objetivo del presente estudio fue el de conocer la prevalencia de factores individuales de riesgo cardiovascular, de SMet y de hipericemia en el personal docente y administrativo de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.

## **Pacientes y métodos**

Utilizando un diseño observacional, transversal, con inclusión de casos prospectivos con muestreo no probabilístico de conveniencia por voluntariedad de participar, se invitó como población de estudio al 100 % del personal de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, quienes suman 787 sujetos: 617 docentes y 170 administrativos, en un esfuerzo conjunto con el Comité de Seguridad Ocupacional de velar por la salud de los trabajadores y hacer medidas preventivas. Los exámenes se realizaron de forma gratuita para el empleado por parte de la Facultad.

Se habilitó una clínica para la adecuada protección de la privacidad de los participantes. Previo consentimiento informado, se procedió a completar un pequeño cuestionario, a la toma de medidas antropométricas, las cuales fueron realizadas por docentes y estudiantes de la carrera de Nutrición capacitados en ello según parámetros de la OMS (para control de sesgo de medición), la toma de tensión arterial por médico investigador y los exámenes de laboratorio por personal de laboratorio clínico. Las variables recolectadas fueron: sociodemográficas (edad, sexo, escuela en que labora, carrera, tipo de personal [si docente o administrativo], tipo de contratación y lugar donde labora en la facultad). Las necesarias para medir FRCV:

sexo, colesterol total sérico, peso corporal relativo (peso y talla para calcular IMC con la fórmula  $\text{peso [kg]} / \text{altura [m}^2\text{]})$  y los necesarios compartidos para calcular SMet: presión arterial definiendo hipertensión como valores  $\geq 130 / \geq 85$  mmHg o el antecedente diagnóstico y tratamiento, y valores de HDL. No se midió tabaquismo, hematocrito ni hallazgos electrocardiográficos. Para medir SMet: circunferencia de la cintura en centímetros, glucemia en ayunas y triglicéridos (reportadas en mg/dl). Las variables fueron procesadas según definición de ATP III y JIS para SMet. Se usaron las definiciones por ATP III y JIS. Para hiperuricemia ácido úrico utilizando los valores  $> 6.0$  mg/dl para mujeres y  $> 7.0$  mg/dl para hombres.

## **Análisis de datos**

Los datos fueron procesados en estadística descriptiva, presentando las variables cuantitativas en medidas de tendencia central con su respectiva dispersión dependiendo de su normalidad y las variables cualitativas en frecuencias absolutas y porcentajes.

Se calcularon las prevalencias generales para:

- a) cada factor individual de riesgo cardiovascular;
- b) SMet en dos definiciones (NECATP III y JIS), así como también la frecuencia de cada uno de los componentes de la definición, y
- c) de hiperuricemia.

Luego las prevalencias se desglosaron para los siguientes grupos: por edad y sexo, excepto donde el factor individual de riesgo correspondía al sexo masculino, y tipo de trabajador (docente o administrativo).

También se realizó estadística inferencial para:

1. Determinar asociación entre características demográficas como edad, sexo y tipo de trabajo y la presencia de SMet,



usando la prueba de chi cuadrado para las variables cualitativas y la prueba de diferencia de medias para variables cuantitativas. Trabajamos con un valor de significancia estadística  $p = 0.05$ .

2. Determinar asociación entre presencia de hiperuricemia y SMet.

Los datos fueron procesados en el programa estadístico SPSS® versión 24.0, licencia de la Unidad de Investigación, Facultad de Medicina UES.

El estudio fue evaluado éticamente previo su desarrollo por el Comité Nacional de Ética de Investigación en Salud y obtuvo su aprobación.

**Tabla 1.** Distribución de la prevalencia de los factores individuales de riesgo cardiovascular por grupos laborales y prevalencia total

Factores individuales de riesgo cardiovascular	Docentes (92) Prevalencia (n.º casos)	Administrativos (114) Prevalencia (n.º casos)	Ambos (4) Prevalencia (n.º casos)	Prevalencia total (n.º casos)
Ser de sexo masculino	35.87% (33)	56.1% (64)	75% (3)	47.6% (100)
Hipertensión arterial	16.30% (15)	21.23% (24) *	33.33% (1)	19.13% (40)*
Hipercolesterolemia (Col total)	2.2% (2)	14.16% (16) †	0	8.61% (18)†
HDL $\leq$ 40 mg/dl	50% (46)	61.95% (70) †	50% (2)	56.45% (118)†
IMC				
Normal	23.9% (22)	13.2% (15)	25% (1)	18.09% (38)
Sobrepeso	40.2% (37)	38.6% (44)	50% (2)	39.52% (83)
Obesidad grado I	29.3% (27)	33.3% (38)	25% (1)	31.43% (66)
Obesidad grado II	4.3% (4)	10.5% (12)	0	7.62% (16)
Obesidad mórbida	2.2% (2)	4.4% (5)	0	3.33% (7)

\*Un sujeto no aceptó tomarse la tensión arterial.

†Otro sujeto no se tomó los exámenes.

HDL: lipoproteínas de alta densidad; IMC: índice de masa corporal.

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterización demográfica

Se incluyó un total de 210 sujetos, constituyendo el 26.68 % de la población esperada. De ese total el 14.91 % correspondía a docentes (92) y el 67.05 % (114) al personal administrativo y 4 personas que fungían con ambas funciones. Ciento diez eran del sexo femenino y 100 del sexo masculino, con una relación femenino: masculino de 1.1:1. La edad media global fue de 47.6 ( $\pm 11.9$ ), rangos de 22 a 77 años; distribuida por sexo, de 47.16 años ( $\pm 12.4$ ) para el masculino y 48.11 años ( $\pm 11.5$ ) para el femenino.

### 4.2 Prevalencia de factores individuales de riesgo cardiovascular

Para los FRCV, a una participante no se le tomó la presión arterial y a otro no se le tomaron los exámenes de laboratorio, quedando la muestra en 208. El peso corporal relativo expresado por el IMC (sobrepeso y obesidad) fue el factor más frecuente, con prevalencia del 81.8 % (Tabla 1). Cuarenta sujetos fueron identificados como hipertensos: 12 tenían altas ambos valores sistólicos y diastólicos, 17 hipertensión sistólica aislada y 11 hipertensión diastólica aislada. Según la distribución de los factores por características demográficas, las prevalencias más altas se encuentran en el grupo del trabajador administrativo (Tabla 1).

### 4.3 Prevalencia de SMet

Para la valoración del SMet, a un participante no se le tomó el diámetro de la circunferencia de la cintura, quedando la muestra en 207. Se encontró una prevalencia total de SMet por definición ATP III del 28.8% (60 casos) y por definición de JIS del 34.78% (72 casos). La diferencia entre ambas definiciones se produjo por el valor de determinación de la circunferencia abdominal, en el cual 29 sujetos quedaban como no obesos según ATP III y sí según JIS. No hubo diferencias por sexo a nivel global, y sí se encontraron diferencias de

prevalencias entre el grupo del sexo femenino en comparación con el masculino por el tipo de labor ( $p = 0.044$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Distribución de la prevalencia de síndrome metabólico por grupos laborales y prevalencia total

Tipo de labor	Sexo	Prevalencia por ATP III	Prevalencia por JIS	Población total
Docente	Femenino	22.03% (13)	22.03% (13)	59
	Masculino	30.30% (10)	33.33% (11)	33
Administrativo	Femenino	43.75% (21)	43.75% (21)	48
	Masculino	23.81% (15)	39.68% (25)	63
Ambos	Femenino	0	0	1
	Masculino	33.33% (1)	66.66% (2)	3
Subtotal todos	Femenino	31.48% (34)	31.48% (34)	108
	Masculino	26.26% (26)	38.38% (38)	99
Total		29% (60)	34.78% (72)	207

JIS: Declaración Conjunta Interina de la Federación Internacional de Diabetes; ATP III: Panel de tratamiento del adulto III del Colegio Americano de Endocrinología.

**Tabla 3.** Distribución del número de componentes del síndrome metabólico presentes en la muestra por definición y por sexo

Numero de criterios	ATP III		Total	JIS		Total
	Masculino	Femenino		Masculino	Femenino	
0	12.1% (12)	4.6% (5)	8.2% (17)	7 (7.1%)	4.6% (5)	5.8% (12)
1	29.3% (29)	28.7% (31)	29% (60)	22 (22.2%)	30.6% (33)	26.6% (55)
2	33.3% (33)	35.2% (38)	34.3% (71)	32 (32.3%)	33.3% (36)	32.9% (68)
3	18.2% (18)	26.9% (29)	22.7% (47)	29% (29)	26.9% (29)	28% (58)
4	7.1% (7)	4.6% (5)	5.8% (12)	8.1% (8)	4.6% (5)	6.3% (13)
5	0	0	0	1% (1)	0	5% (1)

JIS: Declaración Conjunta Interna de la Federación Internacional de Diabetes; ATP III: Panel de tratamiento del adulto II del Colegio Americano de Endocrinología.

Cuantificando la presencia de los componentes de SMet, encontramos que el 8.2% según ATP III y 5.8% por JIS no tienen ningún componente de SMet. El resto tenían por lo menos un componente (Tabla 3). El componente más frecuente fue obesidad, siendo del 70% según definición JIS y del 56% según definición ATP III (Fig. 1).

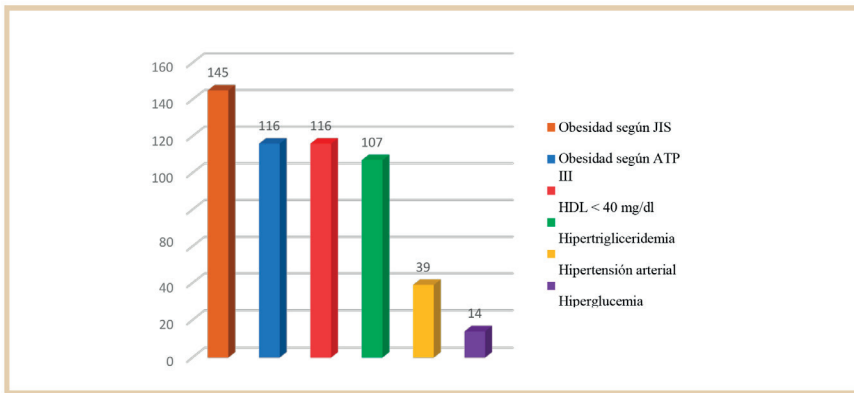
#### 4.4 Prevalencia de hiperuricemia

Se encontró una prevalencia total de hiperuricemia del 4.8 % (10 casos): 8.1 % (8 casos) del sexo masculino y 1.9 % (2 casos) del sexo femenino. La hiperuricemia no se encontró asociada con SMet ninguna definición, sexo ni presencia de hipertensión arterial.

### 5. Discusión

El presente estudio estaba planificado para tener una inclusión del total de la población personal de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, de 787 personas. Hubo una baja participación, el 26.68 % de la población esperada, por lo que considera que tuvimos una alta tasa de no respondedores, introduciéndose el sesgo de selección por el muestreo no probabilístico de conveniencia (los que participaron de forma voluntaria). No se pudo determinar la causa de esta alta tasa de no respondedores, si fue debida a que los sujetos ya estaban conocedores de presentar uno de los factores estudiados, con lo que podríamos decir que estamos mostrando una subestimación, o, al contrario, por sentirse sanos, y entonces podemos tener una supraestimación en nuestros hallazgos. También queda pendiente por analizar la actitud de los profesionales sanitarios docentes hacia el riesgo cardiovascular o hacia la investigación como tal. Pero haciendo el ejercicio del cálculo de muestra para proporciones, teniendo en consideración una población accesible de 787, con un límite de confianza del 5 % y una probabilidad hipotética esperada del 23 % según reportes previos para la región latinoamericana necesitábamos incluir 202 sujetos. Por lo que, si bien se introdujo un sesgo de selección con un muestreo no probabilístico, no se introdujo falta de precisión al estudio y por lo tanto los datos podemos decir que son precisos.

**Figura 1. Distribución de la frecuencia de los componentes del síndrome metabólico**



JIS: Declaración Conjunta Interina de la Federación Internacional de Diabetes; ATP III: Panel de tratamiento del adulto III del Colegio Americano de Endocrinología; HDL: lipoproteínas de alta densidad.

Con la población incluida y estudiada podemos observar que se obtuvieron, de forma general, valores de prevalencia, tanto de los factores individuales de riesgo CV como de SMet, superiores a los mostrados en estudios previos en el país, entre ellos la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENECA) realizada en el 2014 por el Instituto Nacional de la Salud del Ministerio de Salud (INS-MINSAL)<sup>29</sup> que evaluó factores individuales, y otros estudios publicados<sup>26</sup> y no publicados<sup>28</sup> sobre prevalencia de SMet, que reportaban cifras del 23 %. Los factores que no se evaluaron fueron otra limitante que se introdujo por razones propias en la planificación del estudio. No estamos exentos de la epidemia de obesidad ya reportada en otras publicaciones<sup>30</sup>, la cual en nuestra muestra pasa a ser el factor individual conocido como el peso corporal relativo, el más frecuente con cifras tan altas como del 81.8 % cuando sumamos sobrepeso y del 42.2 % cuando dejamos solo obesidad por IMC, y del 70 % (JIS) y el 56 % (ATP III) cuando usamos circunferencia de la cintura. Esto es preocupante en varios aspectos: no solo como el riesgo a la persona, sino que como docente de profesiones sanitarias, que se enseña no solo en clase sino con el modelaje, se está enviando un mensaje de no importancia al cuidado del riesgo cardiovascular

tanto a los estudiantes como a la población en general. Un docente de profesión sanitaria debe dar educación en salud también con su ejemplo. Se debería proponer un estudio a largo plazo para validar el valor corte de la circunferencia de ambas definiciones en relación al riesgo cardiovascular en la población latinoamericana.

El 56.2 % de los sujetos tenían el colesterol HDL bajo, seguido por el 51.7 % con hipertrigliceridemia. Estos factores y componentes se encuentran también con prevalencias altas en comparación con los otros factores que son la hipertensión (18.8 %) y la hiperglucemia (6.8 %). Si bien el riesgo de la dislipidemia se relaciona con la obesidad y la diabetes, que a mayor IMC mayor probabilidad de dislipidemia, también se están al momento haciendo estudios del impacto de la etnia en ella<sup>31</sup>. En nuestra serie encontramos una alta prevalencia de obesidad que justifica la dislipidemia.

El 19.13 % de la población se encontró hipertensa, entre los conocidos y detectados en el estudio. Es interesante ver que se encontró de ellos que en un 70 % tenían o la sistólica alta o la diastólica alta de forma aislada. Esto es importante de conocer, ya que hay estudios que han mostrado diferencias entre ellas en relación a su evolución a muerte cardiovascular, siendo la hipertensión sistólica aislada o coexistente la de mayor riesgo, y la diastólica aislada más benévola con respecto a este desenlace porque se relaciona con menor rigidez de las arterias. En nuestra serie eran más los que tenían la sistólica elevada aislada o coexistente.

Como el síndrome por definición se compone de la presencia de tres o más componentes, durante el procesamiento de datos observamos que la mayoría tenían por lo menos un componente de este, y que solo el 8.2 % con definición ATP III y el 5.8 % con definición JIS no tenían ningún componente, lo que nos puede advertir que muy pronto la cifra de prevalencia de SMet aumentará si no se incide sobre esos componentes.

En el desglose de las subpoblaciones contenidas, pudimos observar que el hecho de ser personal administrativo presentaba pre-

valencias altas, cercanos al doble del grupo de los docentes, tanto de los factores individuales, como de SMet y la diferencia es estadísticamente significativa. Esto es coherente con la literatura respecto a que el sedentarismo es un factor de riesgo para presentar SMet. Pero además el sedentarismo y la falta de actividad física nos reducen el colesterol HDL, que es uno de los hallazgos de este estudio, sin mucho aumento de los triglicéridos o colesterol total.

Con respecto a la hiperuricemia, no podemos comparar contra otros datos de país ni de región que no están existentes y al igual los datos de prevalencia fueron bajos en nuestra muestra.

Por lo que con el estudio queríamos conocer las prevalencias tanto de los factores individuales de riesgo de ECV como de SMet, con un fin preventivo y transmitir la preocupación para educar a la población en este tema que está relacionado con la causa de mortalidad más alta en nuestro país y dar datos a la región que permita la comparación estadística entre países, ya que no pretendemos generalizar los datos que son propios de la situación y contexto donde se han realizado.

## **Agradecimientos**

Al Comité de seguridad y salud ocupacional de la Facultad de Medicina por su apoyo y organización, al decanato de la Facultad de Medicina y al Hospital Chi Mei de China Taiwán por sus aportes económicos para la realización de este estudio.

## Bibliografía

1. Health statistics and information system [Internet]. Ginebra: World Health Organization; 2017 [citado: 21 agosto 2017]. Disponible en: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/index1.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html)
2. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk. A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(14):1113-32.
3. Mahmood SS, Levy D, Ramachandran SV, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular diseases: A historical perspective. *Lancet*. 2014;383(9921):999-1008.
4. Hurley LP, Dickinson LM, Estacio RO, Steiner JF, Havranek EP. Prediction of cardiovascular death in racial/ethnic minorities using Framingham risk factors. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2010;3(2): 181-7.
5. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
6. Friões F, Azevedo A, Castro A, Alvelos M, Pimenta J, Vasquez B, et al. Impacto dos factores de risco cardiovascular numa amostra da população do Porto de acordo com os modelos de predição de risco de Framingham. *Rev Port Cardiol*. 2003;22(4):511-20.
7. Orozco-Gonzalez CN, Cortez-Sanabria L, Viera-Franco JJ, Ramirez-Marquez JJ, Cueta-Manzano AM. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en trabajadores de la salud. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016;54(5):594-601.
8. Risk Function [Internet]. Framingham Heart Study; 2017 [citado: 25 agosto 2017]. Disponible en: <https://www.framinghamheartstudy.org/risk-functions/cardiovascular-disease/10-year-risk.php#>



9. Risk Score Calculators [Internet]. Framingham Heart Study; 2017 [citado: 23 agosto 2017]. Disponible en: <https://www.framingham-heartstudy.org/risk-functions/cardiovascular-disease/index.php>
10. Risk assesment working group [Internet]. National Heart, Lung, and Blood Institute; 2013 [citado: 24 agosto 2017]. Disponible en: [https:// www.nhlbi.nih.gov/sites/www.nhlbi.nih.gov/files/risk-assessment.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/sites/www.nhlbi.nih.gov/files/risk-assessment.pdf)
11. Aschner P, Buendia R, Brajkovich I, Gonzalez A, Figueredo R, Juarez XE, et al. Determination of the cutoff point for waist circumference that establishes the presence of abdominal obesity in Latin American men and women. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93(2):243-7.
12. Alberti GMMK, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006;23(5):469-80.
13. Kassi E, Pervandou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *Biomed Central Medicine.* 2011;5(9):48.
14. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA. Harmonizing the metabolic syndrome. *Circulation.* 2009;120(16): 1640-5.
15. Can AS, Bersot TP. Analysis of agreement among definitions of metabolic syndrome. *Biomed Central.* 2007; 7:353.
16. Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes. *Diabetes Care.* 2008;31(9):1898-904.
17. Dunkley AJ, Charles K, Gray LJ, Camosso-Stefinovic J, Davies MJ, Khunti K. Effectiveness of interventions for reducing diabetes and cardiovascular disease risk in people with metabolic

syndrome: systematic review and mixed treatment comparison meta- analysis. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(7):616-25.

18. Hosseinpanah F, Borzooei S, Barzin M, Golkashani HA, Azizi F. Prognostic impact of different definitions of metabolic syndrome in predicting cardiovascular events in a cohort of non-diabetic Tehranian adults. *Int J Cardiol.* 2013;168(1):369-74.
19. Norris P, Ralph N, Moloney C. Does metabolic syndrome predict sur- gical complications? a protocol for Systematic Review and metaanal- ysis. *Biomed Central.* 2017;6:115.
20. Zhao G, Huang L, Song M, Song Y. Baseline serum uric acid levels as a predictor of cardiovascular disease related mortality and all cause mortality. A meta analysis of prospective studies. *Atherosclerosis.* 2013;231:61-8.
21. Xu Q, Zhang M, Abeysekera IR, Wang X. High serum uric acid levels may increase mortality and major adverse cardiovascular events in patients with acute myocardial infarction. *Saudi Med J.* 2017;38(6): 577-85.
22. Puddu PE, Belarcea G, Vagnarelli OT, Lombardi C, Mancini M, Zancheki A, et al. Serum uric acid and eGFR\_CKDEPI differently predict long term cardiovascular events and all causes of deaths in a residential cohort. *Int J Cardiol.* 2014;171:361-67.
23. Kaur J. Comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014;2014:943162.
24. Rubinstein AL, Irazola VE, Calandrelli M, Elorriaga N, Gutierrez L, Lanas F, et al. Multiple cardiometabolic risk factors in the southern cone of Latin America: A population-based study in Argentina, Chile, and Uruguay. *Int J Cardiol.* 2015;183:82-8.
25. Marquez- Sandoval F, Macedo-Ojeda G, Viramontes-Hörner D, Fernandez Ballart J, Salas Salvado J, Vizmanos B. The pre-

valence of meta-bolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr.* 2011;14(10):1702-13.

26. Juarez XE, Benitez JA, Quezada Galdamez R, Cerritos RW, Aguilar Clara R. Prevalencia del síndrome metabólico en la población urbana de San Salvador. *ALAD.* 2006;14(1):25-33.
27. Orozco- Gonzalez CN, Cortes-Sanabria L, Viera-Franco JJ, Ramirez-Marquez JJ, Cueto-Manzano AM. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en trabajadores de la salud. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2016;54(5):594-601.
28. Rivera Portillo TI, Hernandez Campos LY. Prevalencia de síndrome metabólico en los residentes Medicina Interna, Cirugía General y subespecialidades médicas del Hospital Nacional Rosales Año 2016. 2006. Tesis de graduación de Especialista en Medicina Interna Universidad de El Salvador.
29. Ministerio de Salud/Instituto Nacional de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas no Transmisibles en población adulta de El Salvador ENECA-ELS 2015. San Salvador: Ministerio de Salud /Institiuto Nacional de Salud; 2015.
30. ArroyoJohnson C, Mincey KD. Obesity epidemiology trends by race/ ethnicity, gender, and education: National Health Interview Survey, 1997–2012. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016;45(4):5719.
31. Dal Canto E, Farukh B, Faconti L. Why are there ethnic differences in cardio-metabolic risk factors and cardiovascular diseases? *JRSM Car- diovasc Dis.* 2018;12(7):2048004018818923.
32. Fang J, Shanta M, Cohen H, Aldeman MH. Isolated diastolic hypertension. A favorable finding among young and middle-aged hypertensive subjects. *hypertension.* 1995;26(3).

33. The WHO Steps surveillance Manual. [Internet]. Ginebra: World Health Organization; 2017 [citado: 24 mayo 2017]. Disponible en: <http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2009/STEPSmanual.pdf>

## Capítulo 6. Micología



# Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud

Antonio Vásquez Hidalgo

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascol y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus* sp, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus* sp en El Salvador.

<https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2168>

## Introducción

En nuestro medioambiente la salud es un valor agregado al capital humano. No solo es necesario identificar los riesgos ambientales, sino también contribuir a resolver la problemática encontrada. Es tarea de todos colaborar en la minimización del daño al medioambiente.

En esta ocasión se investiga sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio: el árbol nacascol o nacascolo. Esta semilla tiene una particularidad inerte, necesita la presencia de un hongo del género *Aspergillus* sp, para que, junto con las propiedades del barro, se puedan teñir de color negro las vasijas, lo que les otorga una particular belleza, quizás incluso un aspecto colonial. Asimismo, se puede curtir la piel del ganado vacuno.

Sin embargo, se ha encontrado que en los cinco lotes de semillas se alberga un hongo que infiere daño a la salud luego de exposiciones prolongadas y si la persona tiene las defensas inmunológicas bajas, tal como se demuestra en muchos estudios del género *Aspergillus*, y ya sea por negligencia o desconocimiento, se ignora el «peligro» que encierra la aspiración de las esporas.

En muchas ocasiones las afecciones pulmonares se diagnostican como Bronquitis Aguda o Asma Bronquial, cuando en realidad no se debe descartar una Micosis Pulmonar, y el tratamiento debería conformarse por antimicóticos y no antibióticos. Así también se reportan fenómenos alérgicos.

La investigación estuvo compuesta por tres fases:

- a) Primera fase: Recolección de las semillas de nacascol.
- b) Segunda fase: Extracción y preparación del tanino de la semilla y el hongo.
- c) Tercera fase: Pruebas de laboratorio, que consistieron en sembrar el inóculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud y examinar la muestra por microscopía simple y microscopía electrónica de barrido.

## El descubrimiento

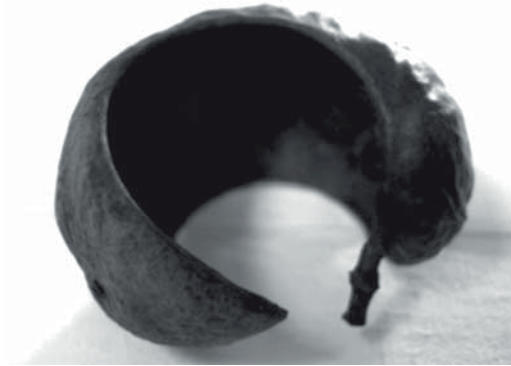
El árbol conocido como nacascol tiene como nombre científico *Caesalpinia coriaria*. Perteneció a la familia *Caesalpinieaceae*, del género *Caesalpinia*. Es una planta leguminosa con tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo (cada una con más de 10 folíolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado) y semillas de color café de aspecto negro.

En estas semillas crece un hongo parecido al *Aspergillus niger*, considerado como patógeno oportunista para el ser humano; sin embargo, su morfología es diferente, sus esporas varían con el anterior. En este caso están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora. Son múltiples, coalescentes, unas pigmentadas y otras claras, de diámetro pequeño, y de color negro a café según pigmentación, no son planas ni rugosas como la de especie *niger*. Al ser cultivadas en medio especial generan una coloración negra con producción de pigmento en la región posterior del tubo antes de las 24 horas al agregar al medio agar saboroud más sustancias oxidantes. Según el análisis fitoquímico preliminar del árbol de *Caesalpinia*



coriaria, contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides. El hongo se reproduce en las semillas del árbol nacascol, luego se cultiva in vitro para la producción del colorante.

**Figura 1-1.** *Semilla de nacascol*



El hongo encontrado en las semillas se describe así:

Esterigmas. La cabeza de la conidia es negra, conidioforo liso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas moderadas de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro.

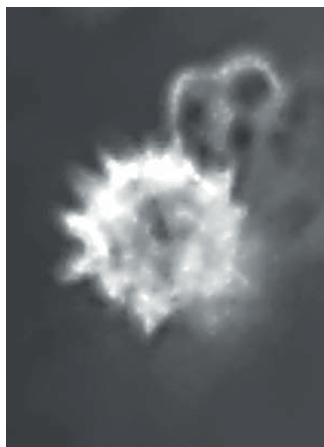
Características macroscópicas: colonia en agar saboraud es de color blanco, luego cambia a verde de aspecto radiado y después se hace negro, el reverso es amarillo o pigmentado de color negro según agente oxidante, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvoriento de color negro.

Características Microscópicas: cabezas conidiales lisas de una pared redonda e irregular, dispuesta en forma radial; estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro; no se observa vesícula o columella; hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza; tiene una hilera de fialides. El esporangio es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro. Las conidias maduras de color café son esféricas con proyecciones

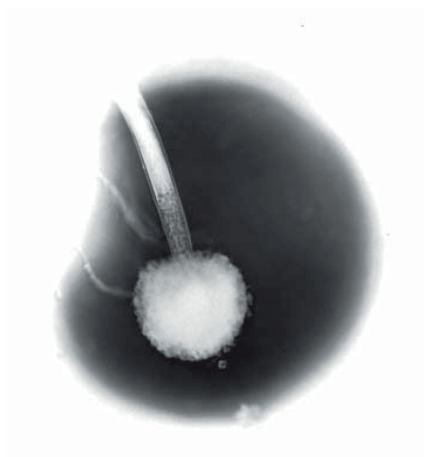
en forma de picos triangulares en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas formando espículas en número mayor de diez. La conidia tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una coraza sólida. Las esporas inmaduras asexuales son esféricas de pared delgada, incolora, de tamaño grande, que luego se llenan formando masas internas de color café. El conioforo es largo, liso, con esporas abundantes. Hay otras conidias que se diferencian de la anterior porque tienen una forma de núcleo al interior de tamaño regular a grande color celeste que adopta del colorante con borde hialino de pared simple más pequeñas que las anteriores, sin protuberancias de aspecto rugoso plano en número no mayor de diez, no forman espículas que corresponde al níger.

En general, la espora es de forma esférica e irregular, aseptada, ameropora, coloreada y oscura del tipo feospora, tamaño grande, cuyo diámetro es de 1 a 3 micras; las hifas no son septadas con micelio continuo. Crece a temperatura ambiente 37 o C.

**Figura 1-2.** *Esporas Aspergillus sp.*40X



**Figura 1-3.** *Vesícula y esporangio del hongo*



En cultivo de agar saboraud de placa y tubo: se observan colonias abundantes de color blanco a verde radiado que cambia a color negro, dispuestos en forma radial del centro hacia fuera, el reverso es color amarillo a pigmentado negro según uso de oxidantes.

En cuanto a esta variedad de *Aspergillus* encontrada, se sugiere que, dada su caracterización morfológica, es otra especie y ha sido encontrada en El Salvador. Esto se ha deducido ya que por la clasificación taxonómica internacional no corresponde a la especie *niger*. Entre sus diferencias importantes están: conidioforo no es liso, no tiene septos, da pigmento al reverso anterior de los tubos, la espora es forma de cactus o mazo o de botella con prominencias triangulares que tienen proyecciones en forma difusa.

Se observa que, si la vasija se coloca, luego del quemado, en el suelo donde están tiradas las semillas de donde se extrajo el colorante, es evidente que se vuelve a contaminar. El contacto de la vasija al horno probablemente quema la espora, ya que la temperatura es de un horno artesanal aproximadamente es de más de 300°C.

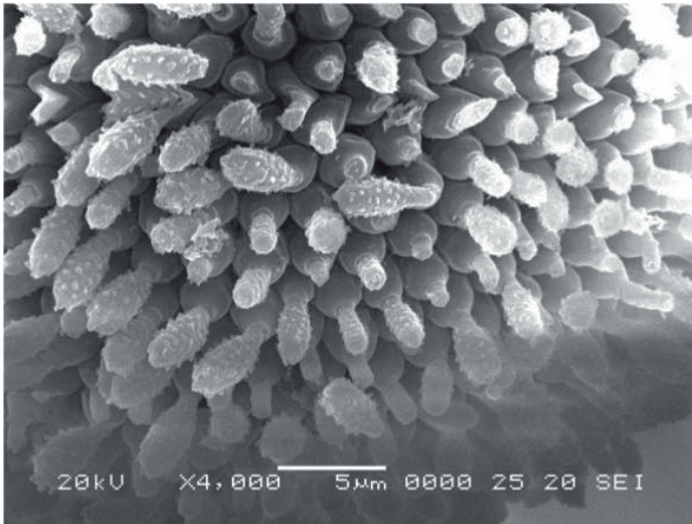
También utilizan esta misma materia prima para las curtiembres de pieles, cuyo proceso es similar. Durante el preparado no usan mascarillas ni guantes de protección. La mayoría de personas que trabajan estas artesanías son humildes y andan descalzas. Además de estas condiciones, se debe agregar que todos somos susceptibles a la presencia del antígeno o alérgeno del hongo, incluso si se reporta la presencia y diseminación del hongo en el suelo.

Por método de laboratorio se encontró, por microscopia, que a las 24 horas del cultivo hubo crecimiento rápido de esporulación, a los cinco minutos. Luego de transcurrida una hora había millones de esporas en diez campos. Esto se puede observar más adelante en la secuencia fotográfica del cultivo y microcultivo del hongo *Aspergillus* sp.

Al revisar el reporte epidemiológico del Ministerio de Salud, se ha encontrado que en estas zonas existe una alta prevalencia de infecciones respiratorias agudas en niños y adultos. Su explicación es

la siguiente: «el problema es viral». Esto revela que desconocen que los fenómenos alérgicos y respiratorios tienen otras causales.

**Figura 1-4.** Imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 X). Cortesía de la doctora Vianey de Ábrego (Tomada en CENSALUD, febrero de 2008)

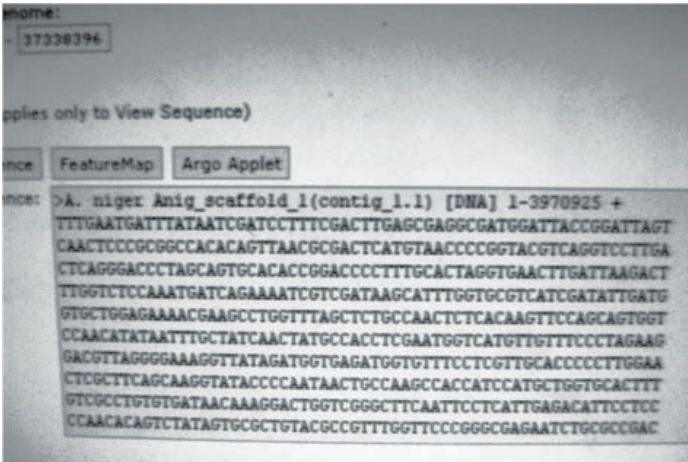


En la Figura 1-4 se observa la imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). Puede notarse, según reporte de CENSALUD, que es un «hongo filamentos, donde sobresalen del micelio las cabezas conidiales, redondeadas. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fialides en forma de botella, en cuyo extremo se fijan las esporas, en este caso solo se aprecia uno no una cadeneta», el conidioforo no tiene septos y es liso, la vesícula es redonda de donde emergen múltiples de una a dos esporas en forma de mazo o cactus con espículas dispersas, en el cultivo dan un pigmento al reverso del tubo, las otras especies no. Fenotípicamente corresponde a otra especie del género *Aspergillus*.

A partir de estudios genotípicos se identificó su pertenencia al género *Aspergillus*, ya que presenta la siguiente secuenciación de ADN.

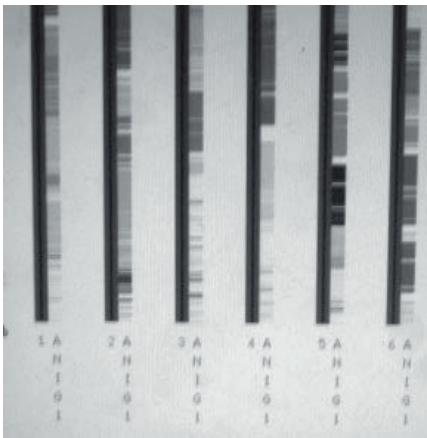
En la Figura 3 se observa la secuenciación del ADN del género *Aspergillus* sp, en la que genotípicamente las secuencias de bases púricas y piridimidicas se diferencian entre las diversas especies del género, tal como se ve el mapa cromosómico en las Figuras 3 y 4.

**Figura 2.** Secuenciación del ADN del género *Aspergillus* sp.



**Fuente:** Broad Institute, *Aspergillus* Comparative Database 2007.

**Figura 3.** ADN cromosomal del género *Aspergillus* sp.



**Fuente:** Broad Institute, *Aspergillus* Comparative Database 2007.

**Figura 4.** Comparación de especies de *Aspergillus* por secuenciación cromosomal de ADN.



## Impacto en la Salud

El contacto directo entre el humano y el hongo tiene como consecuencias el daño a la salud y la erogación del gasto público en la atención de Infecciones Respiratorias Agudas, en los niveles de atención I, II y III de la red del Ministerio de Salud. De tal forma que clasifican en forma general el diagnóstico de Infección Respiratoria Aguda sin explicar la causa de su origen.

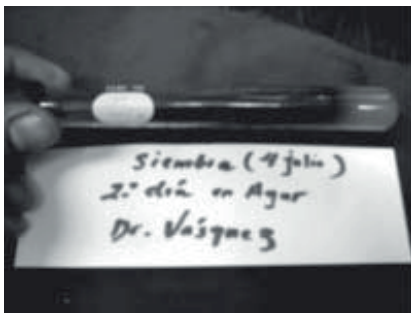
Se ha determinado por amplia revisión bibliográfica que el agente causal de *Aspergillus* da Aspergilosis Broncopulmonar o Alérgica, en otros casos cáncer pulmonar. En esto se incluye, del género *Aspergillus*, las especies de *fumigatus*, *níger*, *terreus*, *flavus*, *nidulans* y *ochraceus*. En nuestro medio es más frecuente el género *Aspergillus* de la especie *níger*.(1)

## Cultivo y microcultivo del hongo *Aspergillus sp*

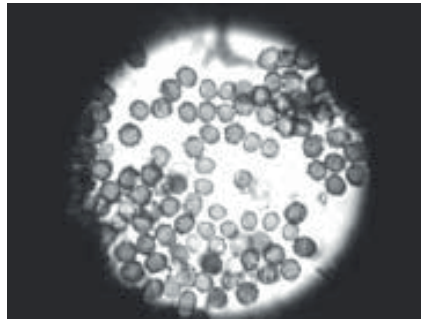
**Foto 1.** Semilla de nacascol. Obsérvese la pigmentación de color café a negro presente en la superficie de la semilla.



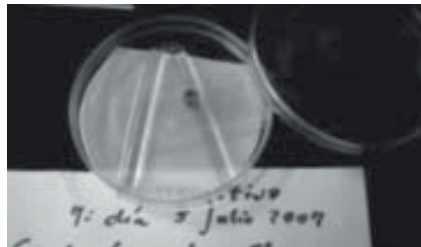
**Foto 2.** Tubo en agar saboraud con el hongo. Siembra de raspado de semilla nacascol que presenta pigmentación de color negro. Se observa que al segundo día el hongo *Aspergillus sp* ya está esporulando rápidamente. Al cuarto día está invadido todo el tubo en agar saboroud.



**Foto 3.** Crecimiento del hongo a las 24 horas, 10x. Se observa en el microscopio 10x que la esporulación a los cinco, quince y treinta minutos es alta, en cincuenta campos está completamente invadido.



**Foto 4.** Microcultivo del hongo. Se hizo microcultivo del hongo y hubo aparecimiento de «mancha» en la placa a las 48 horas.

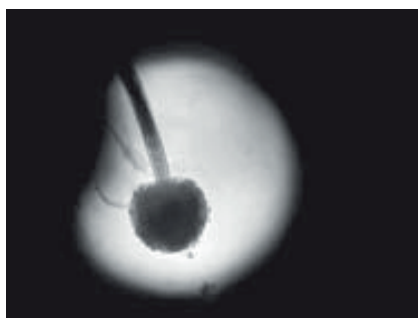




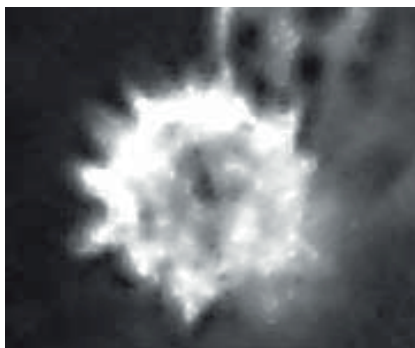
**Foto 5.** Observación del hongo a partir del microcultivo 10x. Se observa el conioforo más la vesícula adherida al medio.



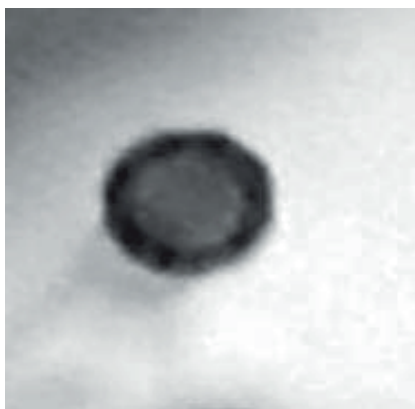
**Foto 6.** Hongo *Aspergillus* sp 10x. Se observa el hongo encontrado en las semillas de nacascol con la vesícula y el conidioforo, presenta inicio de esporas en forma de cadena lineal.



**Foto 7.** Espora del hongo *Aspergillus* sp 40x. Ampliada 100 veces. Se observan esporas encontradas en el cultivo en todas las láminas que se desprenden de las vesículas.



**Foto 8.** Espora del hongo *Aspergillus* Níger 40x. Se observa que la variedad níger es la que está asociada al género *Aspergillus*, pero en las semillas no se encontró esta variedad. La de la foto 7 es la más frecuente, con esporulación alta.





Existen varias formas de aspergilosis que causan enfermedades en el ser humano, entre las más conocidas se encuentran:

- Aspergilosis pulmonar de tipo bronco pulmonar alérgica: se debe a una reacción alérgica al hongo por aspiración. Se desarrolla con asma bronquial.
- Aspergiloma: es un tumor que se desarrolla en un lóbulo pulmonar, como una tuberculosis o absceso pulmonar.
- Aspergilosis pulmonar invasiva: es una infección grave con neumonía que se disemina a otras partes del cuerpo. La infección ocurre en personas con sistemas inmunitarios debilitados debido al cáncer, SIDA, leucemia, trasplante de órganos, quimioterapia entre otros. (2,3,5)

Revisando la literatura, se ha encontrado que los aspergilomas se forman cuando el hongo *Aspergillus* crece como una masa en cavidades pulmonares (pulmón) o cuando el organismo invade tejido previamente sano, y causa un absceso. (4,6-9)

El *Aspergillus*, en altas concentraciones, puede producir aspergilosis. La especie invasora provoca alteraciones pulmonares. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en agricultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. (4)

La forma de reproducción del *Aspergillus* son sus esporas, que con un tamaño de 2 a 3.5  $\mu$ m entran fácilmente a las vías aéreas. Al germinar estas esporas, y ser introducidas en un individuo susceptible (asma atípico, fibrosis quística), forma hifas que colonizan los bronquios. Las hifas tienen de 3 a 7  $\mu$ m de diámetro, y se caracterizan por sus ramificaciones en ángulo de 45 grados. (10-13,1)

El tamaño del inóculo es variable, el número de esporas inhaladas es un factor importante en la producción de Aspergilosis. El asma (atopia), fibrosis quística y asma son de las más frecuentes de consulta externa. (14)

En general el *Aspergillus* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromycetes u hongos imperfectos. Su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fialides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas en forma lineal. (15,10)

Rapper y Fennell las clasifican en 18 grupos, basándose en su aspecto macroscópico y en las características morfológicas de los conidióforos y fialides; de ellas, doce se relacionan con enfermedad humana. Las más importantes son: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*. (16, 18,2)

Otros autores consideran que el *Aspergillus* es un género de alrededor de 200 hongos. Puede existir en dos formas básicas: levaduras e hifas. El *Aspergillus* es filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuesto a las levaduras, que se componen de una sola célula redonda). (18)

El *Aspergillus niger* tiene el micelio lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro, el reverso es blanco amarillento, conidióforos largos y lisos y fialides biseriadas que cubren completamente la vesícula. (10)

Los *Aspergillus* pueden ocasionar múltiples procesos patológicos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran: el pequeño tamaño de sus conidias permite que sean aspiradas y causen infección en el pulmón y en los senos paranasales; su capacidad de crecer rápidamente a 37°C lo hace idóneo para afectar al humano; así como su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos; y la producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células. (9)

El *Aspergillus* por su naturaleza es «patógeno oportunista», es decir, suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos, por lo que su lesión es muy grave.

Los síntomas principales al contraer *Aspergillus* pueden ser: dolor torácico, expectoración con sangre (se observa hasta en un 75% de los pacientes), fiebre, insuficiencia respiratoria, pérdida de peso, sibilancias, tos seca. (18)

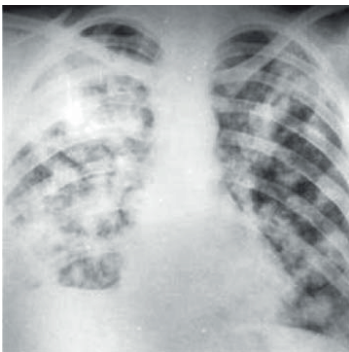
Entre las complicaciones más relacionadas están: dificultad respiratoria progresiva, hemorragia pulmonar, diseminación de la infección, entre otros. La aspergilosis constituye la infección micótica oportunista más frecuente del pulmón, (5) por lo que en pacientes con SIDA es fulminante. (19)

### **Medioambiente**

En la Figura 5 se observa por radiografía de tórax simple un paciente que presenta patrones nodulares característicos de personas que se han contaminado con el hongo *Aspergillus* sp, y que presentan manifestaciones clínicas de una Aspergilosis Pulmonar, y en otros casos Aspergiloma Pulmonar.

Se aclara que este diagnóstico diferencial a priori tiene similitudes con una Bronquitis Aguda, y por desconocimiento los pacientes son tratados con antibióticos, cuando en realidad tendría que ser con un antimicótico.

**Figura 5.** Radiografía de tórax. Se observan opacidades bilaterales con patrón nodular características de aspergilosis pulmonar invasora. <sup>(20)</sup>



El *Aspergillus* es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón, lana y plumas. Su medio ideal son los ambientes oscuros, húmedos y cerrados. Podemos encontrar esporas de *Aspergillus* en los depósitos de trigo, en los edificios en construcción, en los aparatos de aire acondicionado y en los alimentos enmohecidos.

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, ubicuo y cosmopolita que se encuentra en la naturaleza y en las viviendas. Se puede aislar de la tierra, de los sistemas de ventilación, del agua. (4)

Los aspergilos se reproducen con facilidad a temperaturas altas y se encuentran con frecuencia en cereales, forrajes, algodón y algunas aves como las palomas; abundan en materiales orgánicos en descomposición. Las esporas se diseminan por el aire (conidios) y son inhaladas. (5)

Las esporas pueden sobrevivir, en las condiciones adecuadas, durante miles de años. Estudios recientes han demostrado que las esporas de *Aspergillus* mantienen intacta su capacidad invasiva, e incluso parece aumentar su potencial alergénico después de miles de años. Se han encontrado esporas de *A. niger* y *flavus* en la comida, las ropas, las flores y otros objetos de las tumbas de los faraones del antiguo Egipto, en momias y en el sarcófago de Ramsés II.(13) La propagación rápida del *Aspergillus* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado puede ser el origen de los brotes de aspergilosis que acontecen en hospitales y otros edificios después de obras de remodelación o construcción.(4)

Las especies de *Aspergillus* son termoestables y son capaces de crecer a temperatura entre 15 y 53 grados centígrados. Las esporas están presentes todo el año, pero predominan en otoño e invierno, recuperándose de paja, estiércol, madera, vegetales en descomposición, abono de tierra, alcantarillas, deposiciones de aves, heno enmohecido y aire atmosférico.(2-5)

## Prevención en la salud para resolver el problema identificado

La investigación consiste en un nuevo aporte científico de conocimiento en el impacto ambiental en salud de nuestro país, en identificar no solamente el hongo y su localización, sino también en contribuir con la educación sanitaria y ambiental. Incluso en cuanto a capacitar el personal de salud sobre el descubrimiento y conocimiento de aspectos microbiológicos en la prevención de la enfermedad, optando la posibilidad de pensar en otros diagnósticos.

Se ha encontrado que, al utilizar un método sencillo de protección, como el uso de mascarilla y guantes, se reduce considerablemente la diseminación y contaminación de los susceptibles a contraer el hongo, así como otras medidas de eliminar o destruir el hongo durante el preparado. También es importante proteger el producto luego del quemado en otras áreas estériles. También a nivel de suelo se ha reportado la presencia de *Aspergillus*, por lo que es un antígeno o alérgeno susceptible al ser humano.

En conclusión, se encontró una nueva especie de hongo del género *Aspergillus* en las semillas de nacascal y en el suelo salvadoreño en la zona norte del país, el cual será denominado en el futuro con el nombre científico: *Aspergillus* *ues salvadoriensis*, del género *Aspergillus*; *ues*, porque se descubrió en la Universidad de El Salvador, y *salvadoriensis*, porque está en territorio de El Salvador; o es el caso nombre científico binomial: *Aspergillus* *ues salvadoriensis* A Vásquez. Se hizo búsqueda en base de datos de Atlanta CDC y sociedades de micología en donde no se reporta la especie encontrada en particular.

Se agradece a CENSALUD por su colaboración en la toma de macrofotografías electrónicas de barrido y a la doctora Vianney Ábrego.

## Bibliografía

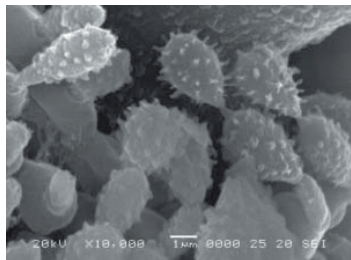
1. Revista Chilena Enfermedades Respiratorias, 2004; 20:30-36
2. Alacalá L. et al. *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica, Madrid, 1998.
3. Rapaer Kb et al. The genus *Aspergillus*. Tratado de Micología Médica. 3a edic, 1998, pp. 668-703.
4. Sarria C. et al. Aspergilosis. Servicio Clínico de Medicina Interna, Madrid, 2005.
5. Gassiot C. et al. Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia. Acta Médica, 2000, 9(1-2): 67-72
6. Baker. S. *Aspergillus* Níger genomics: past, present and into the future. Medical Micology, septiembre, 2006, pp. 44, 517-521.
7. Couri, S. et al. "Digital Image processing a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3TSB8 solid state fermentation: preliminary results", Journal of Microscopy, vol. 224.pt, December 2006, pp. 290-297.
8. Schaberciter-Gurtner et al. Molecular diagnosis of *Aspergillus* and *Candida* infections. J. clinic Microb. 2006. DOI: 10.1128/jcm-01344-06.
9. Kilich, M. Identification of clinically relevant *Aspergillus*. Medical Micology. September 2006, 44, 5127-5131.
10. Universidad de El Salvador. Manual de Diagnostico Micológico. Depto de Microbiología, 2007.
11. Bille, G. et al. *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. Clini. Microbiology Infect. 1998, 4:700-716.

12. Departamento de Microbiología. Atlas Virtual de Micología Médica. Universidad de Panamá, 2007.
13. The Aspergillus Website. Fungal Reseca trust, 2007.
14. Arenas. R. Micología Médica Ilustrada, Mc Graw Hill, México, 2003.
15. Rippon. JW. Tratado de Micología Médica, Mc Graw Hill, México, 1990.
16. Negroni R. Micosis broncopulmonares del adulto y niño, Editores Beta S.R.L, Buenos Aires, 1981.
17. Negroni R. Micosis cutáneas y viscerales, Editores Beta S.R.L, Buenos Aires, 1984.
18. Conant, S. et al. Micología, Interamericana, México, 1972.
19. Torres-Rodríguez JM, Brunet MI. Aspergilosis sistémica. Monografía clínica en Enfermedades Infecciosas. Micosis sistémicas. Doyma. 1991; Cap. 9: 59-69.
20. Arteaga, E. y otros. "Aspergilosis pulmonar invasora en el síndrome de inmunodeficiencia". Rev Iberoam Micol, 1999; 16: 211-215.
21. Broad Institute. Aspergillus Comparative Database, 2007.

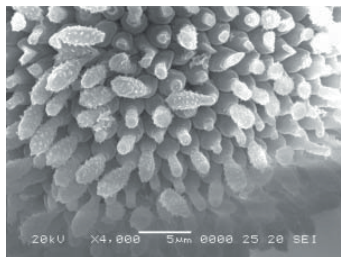
## Anexos

### Comparación de la nueva especie del género *Aspergillus* con especie *Níger*. Microscopía electrónica de barrido

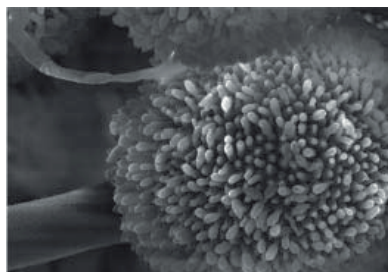
**Foto 1.** Nueva especie del género *Aspergillus*. Cortesía doctora Vianey de Ábrego (CENSALUD, UES, 2008).



**Foto 2.** Nueva especie del género *Aspergillus*. Cortesía doctora Vianey de Ábrego (CENSALUD, UES, 2008).

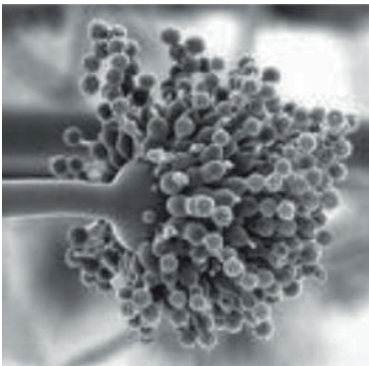


**Foto 3.** Nueva especie del género *Aspergillus*. Cortesía doctora Vianey de Ábrego (CENSALUD, UES, 2008).

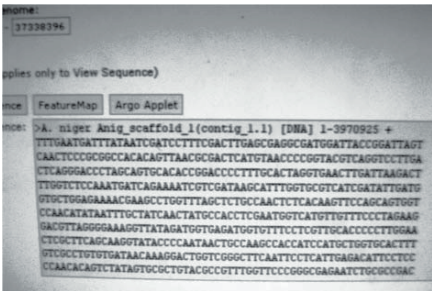




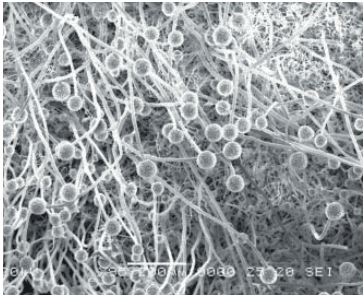
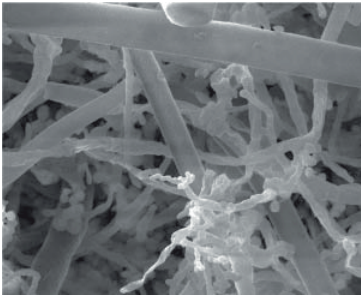
**Foto 4.** Es la especie más frecuente a nivel mundial. Se observa que las esporas son redondas o circulares diferentes a la especie nueva que es en forma de «mazo o botella».

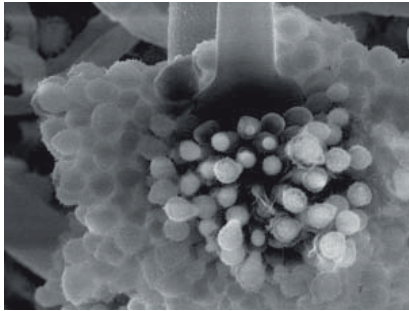
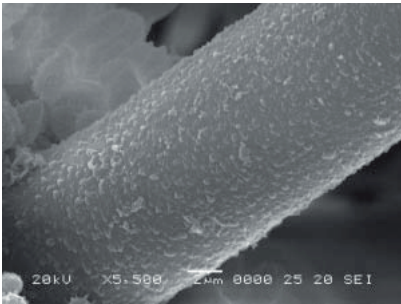
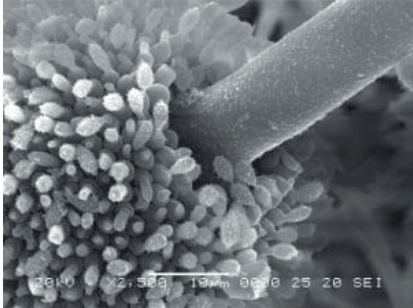


**Foto 5.** Secuenciación de ADN del género *Aspergillus*.



**Microfotografías electrónicas de barrido de la nueva especie** *Corte-sía doctora Vianney de Ábrego, CENSALUD, 2008*





## Capítulo 7. Genómica viral



# Primeras seis secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 por NGS en El Salvador

DOI: 10.5377/alerta.v4i1.10682

Noé Rigoberto Rivera<sup>1</sup>

Orcid: 0000-0001-9553-0554

Carlos Alexander Ortega Pérez<sup>1\*</sup>

Orcid: 0000-0003-1612-8386

Xochitl Sandoval López<sup>2</sup>

Orcid: 0000-0002-0988-1313

Carlos Enrique Hernández Ávila<sup>3</sup>

Orcid: 0000-0002-1230-0102

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, El Salvador; <sup>2</sup>Instituto Nacional de Salud, El Salvador; <sup>3</sup>Departamento de Gobernanza y gestión del conocimiento, Instituto Nacional de Salud El Salvador.

Recibido: 28 de diciembre de 2020

Aceptado: 15 de enero de 2021

Publicado: 22 de enero de 2021

\*Correspondencia: carlos.ortega@ues.edu.sv

Citación recomendada: Rivera NR, Ortega Pérez CA, Sandoval López X, Hernández Ávila CE. Primeras seis secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 por NGS en El Salvador. *Alerta*. 2021;4(1):61-66. DOI 10.5377/alerta.v4i1.10682

Contribución de autoría: NRR1, CAOP2, XSL3, CEHA4. del manuscrito. NRR1, CAOP2, procesaron las muestras y analizaron los datos en las plataformas bioinformáticas.

## Resumen

**Introducción.** En este trabajo se describen las primeras secuencias completas del genoma de SARS-CoV-2 a partir de muestras de pacientes salvadoreños.

**Objetivo.** Reportar las primeras secuencias completas del genoma del SARS-CoV-2 de casos procedentes de El Salvador.

**Metodología.** Se realizó una secuenciación masiva en la plataforma MiniSeq Illumina a partir de muestras de secreción nasofaríngea.

**Resultados.** El análisis filogenético determinó que estas muestras pertenecen al clado 20C secundario de 20A que tiene en común la variante de la mutación D614G de la glicoproteína espícula. La mutación S: D614G fue encontrada en las seis secuencias de SARS-CoV-2. En la plataforma GISAID, las secuencias mostraron pertenecer al clado GH linaje pangolín B.1.2 y B.1.370; ambos linajes están presentes en Estados Unidos.

**Conclusión.** El análisis filogenético evidenció que estas seis muestras pertenecen al clado 20C, clado secundario de 20A, que tiene en común la variante de la mutación D614G de la glicoproteína espícula.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, D614G, NGS, 2019-nCoV, COVID-19.

## Abstract

**Introduction.** This work describes the first complete SARS-CoV-2 genome sequences from samples of Salvadorean patients.

**Objective.** To report the first six complete SARS-CoV-2 genome sequences of six indigenous cases of COVID-19 detected in El Salvador, from nasopharyngeal discharge samples.

**Methodology.** An NGS next generation sequencing was performed from indigenous samples in the Illumina platform MiniSeq.

**Results.** The phylogenetic analysis showed that these isolated belong to the clade 20C secondary of 20A, which have in common the S: D614G variant; the D614G mutation of the spike glycoprotein was found in the six sequences of the SARS-CoV-2 genome. Using the GISAID platform, the sequences were found to belong to the clade GH lineage pangolin B.1.2 y B.1.370, both present in the United States.

**Conclusion.** The phylogenetic analysis showed that these six samples belong to clade 20C, a secondary clade of 20A, which has in common the variant of the spike glycoprotein D614G mutation.

**Keywords:** SARS -CoV-2, D614G, NGS, 2019-nCoV, COVID-19.

## Introducción

El SARS-CoV-2 fue descrito como causante de COVID-19 por primera vez en Wuhan, Hubei, China, el 2 de enero del 2020. En los Estados Unidos de América (EUA), se reportó el primer caso el 20 de enero de 2020, en el estado de Washington D. C., confirmado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, por sus siglas en inglés)<sup>1,2</sup>.

El 18 de marzo se reporta el primer caso confirmado de infección por SARS-CoV-2 en El Salvador. A nivel mundial, las tasas de nuevos casos y muertes por COVID-19 continuaron aumentando, con casi 4 millones de nuevos casos y 60 000 nuevas muertes registradas. Al 15 de noviembre de 2020, se había notificado a la OMS 53,7 millones de casos confirmados y 1,3 millones de muertes<sup>3</sup>.

El 3 de febrero se publicó la secuenciación del ARN de una muestra de líquido de lavado bronco alveolar de un paciente que trabajaba en un mercado de Wuhan y que ingresó en el Hospital Central de Wuhan el 26 de diciembre de 2019, mientras experimentaba un síndrome respiratorio severo que incluía fiebre, mareos y tos. Así, se identificó una nueva cepa de virus ARN de la familia Coronaviridae, que se designó en ese momento como co-

ronavirus «WH-Human 1» (y también se le conoció como «2019-nCoV»). El análisis filogenético del genoma viral completo (29 903 nucleótidos) reveló que el virus estaba estrechamente relacionado en un 89,1% con un grupo de coronavirus similares al SARS del género Betacoronavirus, subgénero Sarbecovirus, encontrado previamente en murciélagos en China<sup>4</sup>.

A partir de ese momento varios países comenzaron a publicar las secuencias obtenidas de pacientes locales y al momento de redacción del presente reporte, la última actualización del 27 de noviembre de 2020 publicada en la plataforma Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, por sus siglas en inglés), registraba 3407 genomas, muestreados entre diciembre de 2019 y noviembre de 2020.

Como país es importante poder obtener las secuencias de SARS-CoV-2 a partir de muestras respiratorias de pacientes locales con COVID-19, pues esta información ayudará a comprender en parte el variado espectro clínico y curso de la enfermedad. Además, desde el punto de vista de la epidemiología molecular, permite comparar las secuencias entre diferentes poblaciones del mundo con las secuencias del país y analizar la evolución del virus a medida avanza la pandemia. Esto será de mucha utilidad para predecir qué podría pasar en los próximos años en el país y cómo responder ante esa eventualidad. Al principio de la pandemia las secuencias estudiadas han permitido determinar linajes, cadenas de transmisión y rutas de infección. Estas secuencias completas también nos permiten evaluar la variabilidad genética del virus a nivel local, su evolución y el poder predecir algunos factores pronósticos de los pacientes. De igual forma, aunque algunos estudios estadísticos proponen que las mutaciones descritas en la mayoría de secuencias reportadas hasta el momento no demuestran mayor relación con la virulencia, patogenicidad e incluso transmisibilidad e infectividad viral<sup>5</sup>, estudios recientes de prestigiosos grupos investigadores han demostrado el aumento del potencial de transmisión de las variantes con la mutación D614G, que predomina a nivel mundial<sup>6-9</sup>. Los cambios en la secuencia son importantes; sin embargo, las



secuencias también permiten evaluar el grado de conservación de las regiones del genoma viral, las cuales son incidentes para el estudio de métodos diagnósticos, blancos de fármacos antivirales, así como en la elaboración y seguimiento de eficacia de las vacunas.

Se reportan las primeras seis secuencias completas del genoma del SARS-CoV-2 de seis casos de COVID-19 detectados en El Salvador, a partir de muestras de secreción nasofaríngea.

Con la descripción de estas primeras secuencias se inicia una serie de publicaciones sobre la vigilancia genómica del virus SARS-CoV-2 que serán útiles para conocer la evolución del virus, desarrollo de terapias y vacunas.

## **Metodología**

Se analizaron 50 eluidos de ARN de secreción nasofaríngea obtenida de pacientes positivos a la prueba de qRT-PCR para SARS-CoV-2, diagnosticados en el Laboratorio Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (INS) y la Sección de Virología y Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. La extracción se realizó con el kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit Invitrogen de ThermoFisher Scientific. Todos los eluidos fueron conservados a -80 °C posterior a la extracción.

Se realizó la confirmación diagnóstica por qRT-PCR de los genes E y RdRp con dos protocolos: Charité, Berli/EVAg<sup>10</sup> con la Ag- Path-ID One-Step RT-PCR de ThermoFisher Scientific y con el PowerChek 2019-nCoV Real-time PCR kit (<https://www.fda.gov/media/140069/download>). Las amplificaciones se realizaron en el QuantStudio 5 Real-Time PCR instrument de Applied Biosystems.

De 50 eluidos se escogieron 6 eluidos con CT inferior a 25 con una concentración  $\geq 50$  ng/ $\mu$ L de ARN determinado por fluorometría con Quantus fluorometer, Promega.

Se utilizó el método de secuenciación con enfoque de amplicones aplicando una variante de reacciones de PCR multiplex de dos grupos con el kit de Paragon CleanPlex® SARS-CoV-2 by SOPHiA, que ha presentado buenos resultados en estudios comparativos de secuenciación masiva (NGS Next- Generation Sequencing)<sup>11,12</sup>, siguiendo el protocolo del fabricante. Para la generación de los amplicones se utilizó el termociclador eppendorf Flexlid Mastercycler Nexus gradient.

### **Secuenciación masiva (NGS)**

Se utilizó la plataforma MiniSeq Illumina con el MiniSeq Rapid High Output Reagent Kit; como control de calidad interno para la generación, secuenciación y alineación de conglomerados se utilizó PhiX control v3 de Illumina.

Para el almacenamiento, análisis y gestión de datos en formato FASQ producto de la secuenciación, se utilizó la plataforma informática Base Space Sequence de Illumina. Para el alineamiento preliminar, determinación de las variantes por mutaciones y asignación preliminar de clados, se utilizó la plataforma bioinformática SOPHiA-DDM- V5.7.10. Se realizó alineación de las secuencias obtenidas con secuencias consenso NC\_045512 en la plataforma en línea FASTA ([ebi.ac.uk/tools/sss/fasta/](http://ebi.ac.uk/tools/sss/fasta/)), para generar archivos compatibles para la generación de propuestas filogenéticas como MEGA-X v10.2. Las seis secuencias obtenidas se cargaron para su análisis de variantes por clado a Nexclade beta v0.8.1; finalmente los resultados de las secuencias fueron enviados a GISAID<sup>13</sup> para la determinación de clado y linaje filogenético, ya que esto permitió clasificar y validar los virus secuenciados en una plataforma ya ampliamente reconocida por la comunidad científica global<sup>14</sup>.

### **Consideraciones éticas**

El protocolo de investigación fue sometido y aprobado por el comité local de ética del INS; los investigadores no tuvieron acceso a

la identidad de los pacientes u otros datos sensibles. Las muestras fueron manejadas por un número de referencia asignado por el Laboratorio Nacional de Salud Pública. Los datos de la secuenciación están disponibles en la plataforma GISAID bajo los siguientes registros: EPI\_ISL\_671974, EPI\_ISL\_671978, EPI\_ISL\_672012, EPI\_ISL\_672570, EPI\_ISL\_672572, EPI\_ISL\_672573.

## Resultados

En las seis secuencias mediante el alineamiento con el genoma de referencia NC\_045512 se observó una concordancia de casi el 100 %, confirmando que las mismas eran positivas a SARS-CoV-2. De igual forma, las seis secuencias dieron positivo a SARS-CoV-2 en el análisis preliminar en la plataforma bioinformática SOPHiA-DDM-V5.7.10. Además, se analizaron los genes E, M, N, ORF10, ORF1a, ORF1ab, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, S, dentro de los cuales se identificó un total de 27 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), desde 10 y hasta 15 SNP en cada una de las seis secuencias. Algunos de los SNPs comunes entre las secuencias, además la mayoría de los SNP identificados, fueron sin sentido (missense), implicando un cambio de aminoácido. Las secuencias basadas en los SNP identificados se agruparon en un solo patrón variante, impulsado principalmente por SNP ubicados en la región S, NSP2, NS3 y gen S, presentando las mutaciones A23403G (S<sup>D614G</sup>), C1059T (NSP2<sup>T265I</sup>) y G25563T (NS3<sup>Q57H</sup>). En el alineamiento con patrón de mutaciones las seis secuencias fueron clasificadas en el clado Nextstrain 20C (Figura 1-A).

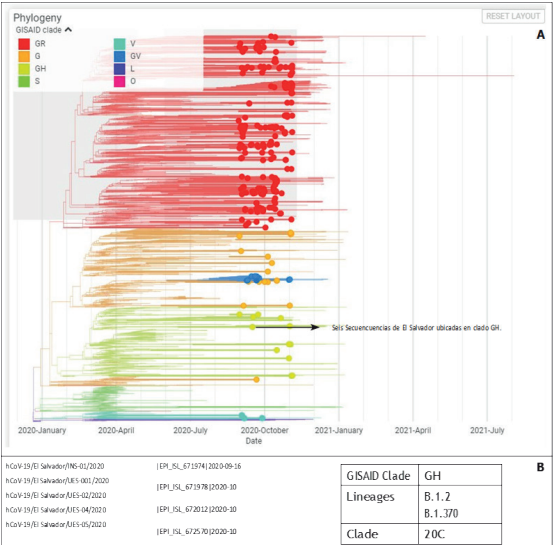
Además, se utilizó GISAID para la filogenia de máxima probabilidad de secuencias muestreadas globalmente de SARS-CoV-2<sup>14,15</sup>. El resultado de la comparación del patrón de mutaciones comparada con la base de secuencias y de manera particular con la secuencia de referencia hCoV19/Wuhan/WIV04/2019, las seis secuencias fueron clasificadas como clado GISAID GH, linaje pangolín B.1.2 y B.1.370, ambos linajes de EUA (Figura 1-B) coincidente con el 20C de Nextstrain.

Tabla 1. Polimorfismos de un solo nucleótido

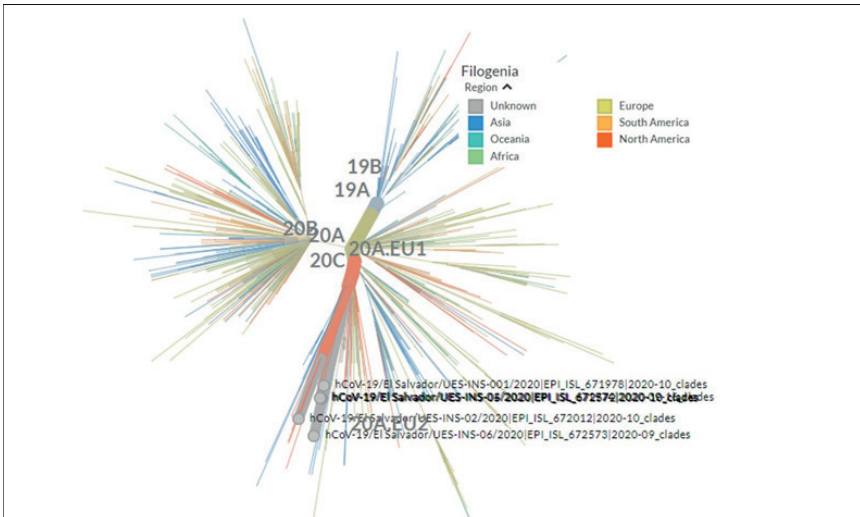
Polimorfismo de un solo nucleótido		
N_P199L	NSP12_K59N	NSP2_T85I
N_P67S	NSP12_P323L	NSP2_S430L
N_R209K	NSP13_L256F	NSP3_H727Y
NS3_G172V	NSP13_N124S	NSP3_K384N
NS3_P258S	NSP14_N129D	NSP5_L89F
NS3_Q57H	NSP14_P203L	NSP9_S13F
NS7a_T39I	NSP15_V320L	Spike_A623S
NS8_S24L	NSP16_R216C	Spike_D614G
NS8_V62L	NSP2_T265I	Spike_S704L

Al rastrear geográficamente el virus por Nextstrain, las seis secuencias mostraron tener mayor similitud con el clado GH (20C) presente en la región norteamericana (Figura 2).

Figura 1. (A) Filogenia clados 19A,19B, 20A, 20C según clades. nextstrain.org/tree; filogenia según clados GISAID GR, G, GH, O, S, L, V. Las seis secuencias en verde alineadas en clado GH (B); las seis secuencias por alineamiento por perfil de mutaciones fueron clado 20C (Nextstrain), clado GH Linage B.1.2 y B.1.370 (GISAID)



**Figura 2.** Filogenia por región geográfica para los clados 19A, 19B, 20A, 20C según clades.nextstrain.org/tree. Las seis secuencias en gris alineadas en clado 20C, obsérvese el gran número de secuencias norteamericanas en rojo



## Discusión

Las seis secuencias fueron aceptadas y dadas de alta en GISAID. Esta información de SARS-CoV-2 apoya la calidad del proceso de secuenciación, robustece la vigilancia epidemiológica y permitirá seleccionar para el país la vacuna más representativa.

Con el análisis en la plataforma SOPHiA, ninguna de las mutaciones se asoció a mayor virulencia o patogenicidad; sin embargo, sí se encontró la mutación Spike\_D614G que actualmente está siendo ampliamente estudiada por su posible relación con mayor infectividad de la proteína espícula, lo cual aumentaría su transmisibilidad<sup>6</sup>.

En el alineamiento con patrón de mutaciones, las seis secuencias fueron clasificadas en el clado Nextstrain 20C, caracterizado por la mutación A23403G, C1059T y G25563T. Esta alcanzó una frecuen-

cia global en torno al 20 % en abril, principalmente por secuencias de EUA<sup>1,19</sup>; 20C es un clado que se derivó del clado 20A muy frecuente en EUA y que sembró grandes brotes en Europa a principios de 2020, dominando en los posteriores brotes en las Américas. Además, una de las características de este clado es la presencia de la mutación D614G, la cual se ha relacionado con aumento de la infectividad viral<sup>9,7 16-18</sup>.

Los resultados demostraron que las seis secuencias fueron clasificadas como clado GISAID GH, linaje pangolín B.1.2 y B.1.370, ambos linajes con una alta prevalencia en EUA<sup>16-18</sup>. Es probable que la migración influya en este patrón, para lo que se requiere obtener más secuencias de todo el territorio nacional, caracterizar epidemiológicamente para conocer su probable origen, documentando la vigilancia molecular del virus y comprender mejor su evolución en el territorio salvadoreño.

Las mutaciones encontradas serán estudiadas a profundidad y se informarán en una próxima entrega. Los SNPs son candidatos fenotípica o epidemiológicamente interesantes para futuras investigaciones, en combinación con pruebas experimentales la verificación de cualquier fenotipo predicho, como es el caso de la mutación D614G.

## **Conclusiones**

Este es el primer reporte de secuencias completas del genoma de SARS-CoV-2 en El Salvador e identifica una variante predominante en Centro y Norteamérica, específicamente el clado GH, linaje pangolín B.1.2 y B.1.370, ambos linajes con una alta prevalencia en EUA.

El análisis filogenético evidenció que estas seis muestras pertenecen al clado 20C, clado secundario de 20A, que tiene en común la variante de la mutación D614G de la glicoproteína espícula.

Los autores declaran no tener conflictos de interés en el estudio ni haber recibido patrocinio de instituciones privadas; la fuente de

financiamiento utilizada fueron recursos estatales designados para investigación.

Se reconoce el apoyo de las máximas autoridades de la Universidad de El Salvador, Instituto Nacional de Salud y Ministerio de Salud; agradecimientos especiales a la Sección de Virología del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador y a la Sección de Virología del Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador.

## Referencias bibliográficas

1. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 2020;26(6):1266-1273. DOI:10.3201/EID2606.200516
2. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofv K.H, Wiesman J, Bruce H, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(10):929-936. DOI:10.1056/nejmoa2001191
3. World Health Organization. Weekly Epidemiological Update on COVID-19. World Health Organization. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---3-november-2020>
4. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-269. DOI:10.1038/s41586-020-2008-3
5. Van Dorp L, Richard D, Tan CC, Shaw L, Acman M, Balloux F. No evidence for increased transmissibility from recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Nature Communications*. 2020. DOI:10.1101/2020.05.21.108506

6. Jackson CB, Zhang L, Farzan M, Choe H. Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020. DOI:10.1016/j. bbrc.2020.11.026
7. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Better K, Yoon H, Theiler J, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020;182(4):812-827.e19. DOI:10.1016/j. cell.2020.06.043
8. Zhang L, Jackson CB, Mou H, Ojha A, Peng H, Quilan BD, et al. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Communications*. 2020;1-9. DOI:10.1038/ s41467-020-19808-4
9. Zhang L, Jackson C, Mou H, Ojha M, Rangarajan E.S, Izard T, et al. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *bioRxiv*. 2020. DOI:10.1101/2020.06.12.148726
10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D.K.W, et al. Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020;25(3):1-8. Disponible en: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay\\_v1991527e-5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88\\_21](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay_v1991527e-5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_21)
11. Klempt P, Brož P, Kašný M, Novotný A, Kvapilová K, Kvapil P. Performance of targeted library preparation solutions for SARS-CoV-2 whole genome analysis. *Diagnostics*. 2020;10(10):1-12. DOI:10.3390/diagnostics10100769
12. Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, et al. Evaluation of NGS- based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evolution*. 2020. DOI:10.1093/ve/veaa075



13. GISAID - phylodynamics of pandemic coronavirus in Latin America and the caribbean. GISAID. 2020. Fecha de consulta: 22 de diciembre de 2020. Disponible en: [isaaid.org/ epiflu-applications/ phylodynamics/](https://isaaid.org/epiflu-applications/phylodynamics/)
14. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global Challenges*. 2017;1(1):33-46. DOI:10.1002/ gch2.1018
15. Rambaut A, Holmes EC, Hill V, O'Toole Á, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*. 2020;5(11):1403-1407. DOI:10.1038/s41564-020-0770-5
16. Toyoshima Y, Nemoto K, Matsumoto S, Nakamura Y, Kiyotani K. SARS-CoV-2 genomic variations associated with mortality rate of COVID-19. *Journal of Human Genetics*. 2020;65(12):1075-1082. DOI:10.1038/s10038-020-0808-9
17. Hodcroft EB, Zuber M, Nadeau S, Candelas F, Standler T, Nether RA, et al. Emergence and spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. *medRxiv*.2020. DOI: 10.1101/2020.10.25.20219063
18. Pfefferle S, Günther T, Kobbe R, Czech-Sioli M, Indenbirken D, Robitaille A, et al. SARS Coronavirus-2 variant tracing within the first Coronavirus Disease 19 clusters in northern Germany. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020. DOI:10.1016/j.cmi.2020.09.034
19. Ministerio de Ciencia y Economía; Instituto de Salud Carlos III. Informe del Grupo de Análisis Científico de Coronavirus del ISCIII (GACC-ISCIII). Madrid. Instituto Carlos III. 2020. 8 p. Disponible en: [https://fundadeps.org/wp-content/uploads/2020/04/ TRANSMISIÓN-DEL-VIRUS\\_1.pdf](https://fundadeps.org/wp-content/uploads/2020/04/TRANSMISIÓN-DEL-VIRUS_1.pdf)

# Análisis de la mutación D614G en secuencia del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador

DOI: 10.5377/alerta.v4i1.10683

Carlos Alexander Ortega Pérez<sup>1</sup>

Orcid: 0000-0003-1612-8386

Noé Rigoberto Rivera<sup>2\*</sup>

Orcid: 0000-0001-9553-0554

Xochitl Sandoval López<sup>3</sup>

Orcid: 0000-0002-0988-1313

Carlos Enrique Hernández Ávila<sup>4</sup>

Orcid: 0000-0002-1230-0102

<sup>1y2</sup>Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, El Salvador; <sup>3</sup>Instituto Nacional de Salud, El Salvador; <sup>4</sup>Departamento de Gobernanza y gestión del conocimiento, Instituto Nacional de Salud El Salvador.

\*Correspondencia: [noe.rivera@ues.edu.sv](mailto:noe.rivera@ues.edu.sv)

**Citación recomendada:** Ortega CA, Rivera NR, Sandoval López X, Hernández CE. Análisis de la mutación D614G en secuencia del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador. Alerta. 2021;4(1): DOI: 10.5377/alerta.v4i1.10683

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés en el estudio ni haber recibido patrocinio de instituciones privadas; la fuente de financiamiento utilizada fueron recursos estatales designados para investigación.

## Resumen

**Introducción.** El 18 de marzo se reporta el primer caso de infección por SARS-CoV-2 confirmado en El Salvador y durante el mes de octubre de 2020 se logra secuenciar el genoma de SARS-CoV-2 a partir de muestras obtenidas en el país.

**Objetivo.** Analizar in silico las mutaciones detectadas en las secuencias aisladas en El Salvador. Metodología. Se utilizó la plataforma SOPHiA-DDM-V5.7.10., para la determinación de las variantes por mutaciones con sentido erróneo. Se utilizó la plataforma Nexclade

beta v0.8.1.; se visualizó y comparó la proteína S silvestre (D614: PDB ID: 6VXX) y de la variante mutada (D614G: PDB ID: 6XS6). Para el modelamiento y generación de imágenes de los detalles moleculares de las proteínas se utilizó Pymol-v1.7.2.3.

**Resultados.** Los cristales de la proteína S silvestre y mutada muestra diferencias a nivel molecular, incluyendo la pérdida de interacciones entre el residuo G614 del dominio S1 y la treonina 859 de dominio S2, favoreciendo de esta manera la conformación abierta de la proteína S, la cual es necesaria para la interacción de S con el receptor ACE2.

**Conclusión.** Los hallazgos confirman el predominio de la variante D614G en este grupo de secuencias, lo cual probablemente favorece su transmisibilidad, que puede explicarse por la configuración de los sitios de unión con receptor ACE2. El predominio mundial de la D614G y las evidencias de laboratorio y bioinformáticas publicadas hasta la fecha, apuntan hacia una posible mayor infectividad y transmisibilidad.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, D614G, NGS, 2019-nCoV, COVID-19.

## Abstract

**Introduction.** The genome sequencing of indigenous samples of SARS-Cov-2 was carry out in October 2020.

**Objective.** To analyze in silico the detected mutation in the isolated sequences in El Salvador. Methodology. The sequences were analyzed using the SOPHiA-DDM-V5.7.10 bioinformatic platform; the platform Nexclade beta v0.8.1 was used for the determination of variants due to missense mutation; the indigenous protein S (D614: PDB ID: 6VXX), was visualized and compared as well as the one from the mutant variant (D614G: PDB ID: 6XS6); Pymol-v1.7.2.3. was used in modeling and imaging generation of the proteins' molecular details.

**Results.** The analysis of the wild protein S crystals and the mu-

tant ones, show differences at molecular level, including the loss of interactions between the residue G614 of the S1 domain and the threonine 859 of the S2 domain, favoring in such manner, the open configuration of the protein S, which is necessary for the interaction between S with the ACE2 receptor.

**Conclusion.** The global dominance of the D614G and the bioinformatic and laboratory evidences published up to date, show a possible higher infectivity and transmissibility conferred by the variant D614G detected in the sequence of SARS-CoV-2 in El Salvador.

**Keywords:** SARS-CoV-2, D614G, mutación, 2019-nCoV, COVID-19.

## Introducción

El SARS-CoV-2 fue identificado por primera vez en Wuhan, Hubei, China en diciembre del 2019 en un brote de un mercado de mariscos. El primer caso en EUA, fue confirmado en el estado de Washington D.C. el 20 de enero del 2020<sup>1,2</sup>. El 18 de marzo se reporta el primer caso de infección por SARS-CoV-2 confirmado en El Salvador<sup>3</sup>. A partir del primer caso de infección por SARS-CoV-2 en Wuhan, se analizó el genoma viral completo, revelando que el virus estaba más estrechamente relacionado con un grupo de coronavirus similares al SARS encontrado previamente en murciélagos en China<sup>4</sup>. Durante el año 2020 el SARS-CoV-2 se extendió de manera progresiva y sostenida por todo el mundo; en marzo se reportó el primer caso de infección por SARS-CoV-2 en El Salvador<sup>3</sup> y en de octubre de 2020 se logra secuenciar el genoma de SARS-CoV-2 a partir de muestras obtenidas de pacientes de El Salvador, con las secuencias obtenidas se analizó in silico las mutaciones detectadas en el país en particular la mutación D614G.

Los coronavirus del género Betacoronavirus infectan solo a mamíferos pudiendo causar enfermedades respiratorias y gastroenteritis<sup>5</sup>. Los coronavirus HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HKU1 clásicamente han causado afecciones respiratorias leves en

humanos<sup>4,5</sup>. Sin embargo, dos virus altamente patógenos, SARS-CoV y MERS-CoV causan en humanos síndrome respiratorio severo agudo en humanos<sup>5,6</sup>.

Los coronavirus forman partículas esféricas o pleomórficas envueltas de 100 a 160 nm de diámetro, contienen un genoma de ARN monocatenario (ssRNA) de sentido positivo, con un tamaño entre 27 a 32 kb. El genoma de SARS-CoV-2, de aproximadamente 30 kb, codifica para 14 marcos de lectura abierto (ORF del inglés Open Reading Frame). En el extremo 5' del genoma viral, los primeros son los ORF1a y ORF1ab, que ocupan aproximadamente dos tercios de la longitud total del genoma, codifican para poliproteínas que ayudan a controlar los ribosomas del huésped para su propio proceso de traducción, los que se procesan autoproteolíticamente en 16 proteínas no estructurales que forman el complejo replicasa-transcriptasa. Un desplazamiento del marco de lectura entre ORF1a y ORF1b conduce a la producción de dos polipéptidos: pp1a y pp1ab. Estos polipéptidos son procesados por proteasas similares a quimotripsina codificada viralmente (3CL pro) o proteasa principal (M pro) y una o dos proteasas similares a la papaína en 16 NSPs (NSP1- NSP16). Este complejo replicasa-transcriptasa consta de múltiples enzimas, incluida la proteasa similar a la papaína (NSP3), la proteasa principal (NSP5), el complejo primasa NSP7-NSP8, la ARN polimerasa primaria dependiente de ARN (NSP12), una helicasa-trifosfatasa (NSP13), una exoribonucleasa (NSP14), una endonucleasa (NSP15), N7- y 2'O- metiltransferasa (NSP10 y NSP16). En el extremo 3' otros ORFs en el tercio distal del genoma codifican para al menos cuatro proteínas estructurales principales: proteína de espícula (S), glicoproteína de membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N), además nueve factores accesorios putativos<sup>7-10</sup>.

Se sabe que el SARS-CoV-2 tiene al menos seis proteínas accesorias (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 10) según la anotación actual (GenBank: NC\_045512.2). Sin embargo, aún no se ha verificado experimentalmente la expresión de los ORFs y no está claro qué genes accesorios se expresan realmente a partir de este genoma compacto<sup>11</sup>. Muchas de estas proteínas funcionales y estructurales virales tienen una fun-

ción ya definida; sin embargo, algunas aún están pendientes de definir su función<sup>10</sup>.

La entrada del SARS-CoV-2 en la célula hospedadora es mediada por la glucoproteína transmembrana Spike (S) que forma homotrímeros (Figura 1) que protruyen en la superficie viral<sup>12</sup>.

Con un tamaño de 180-200 kDa, la proteína S consta de un extremo N-terminal externo, un dominio transmembrana (TM) anclado en la membrana viral y un extremo corto C-terminal (CT)<sup>13</sup>. El número total de residuos de aminoácidos de la proteína S es de 1273 aa y consta de un péptido señal (aminoácidos 1-13) ubicado en el extremo N-terminal, la subunidad S1 (residuos 14- 685) y la subunidad S2 (residuos 686-1273). En la subunidad S1 se encuentra un dominio N-terminal (residuos 14-305) y una región de unión al receptor de dominio (RBD, por sus siglas en inglés Receptor Binding Domain) (319-541 residuos). En la subunidad S2 encontramos el péptido de fusión (residuos 788-806), la secuencia de repetición de heptapéptido 1 (HR1) (residuos 912-984) HR2 (residuos 1163-1213), el dominio transmembrana o TM (residuos 1213-1237), el dominio citoplasmático (residuos 1237-1273) y el péptido de fusión (FP) (residuos 788-806)<sup>14</sup>. Los trímeros de la proteína S forman visualmente los característicos bulbos en forma de corona que rodea la partícula viral<sup>15</sup>. La estructura atómica tridimensional del homotrímero S del SARS-CoV-2 (figura 1.A) ha sido resuelta por microscopía crioelectrónica, revelando diferentes conformaciones del dominio RBD de la proteína S en dos estados: abierto y cerrado<sup>16,17</sup>.

El RBD de la región distal de S1 es un dominio de unión al receptor celular y contribuye además a la estabilización del estado de prefusión de la subunidad S2, anclada a la membrana que contiene la maquinaria de fusión<sup>18,19</sup>. Para todos los CoVs, S se escinde adicionalmente por proteasas del hospedador en el denominado sitio S20, ubicado antes del péptido de fusión<sup>20,21</sup>. Se ha propuesto que esta escisión activa la proteína para que se fusione con la membrana a través de amplios e irreversibles cambios conformacionales<sup>22</sup> Como resultado, la entrada del coronavirus en las células susceptibles es

un proceso complejo que requiere la acción concertada de unión al receptor y procesamiento proteolítico de la proteína S para lograr finalmente la fusión virus-célula.

Cada una de los RBD de los monómeros o protómeros de proteína S1 que forman la espícula del SARS-CoV-2 puede individualmente adoptar una conformación abierta o cerrada<sup>12,16</sup>.

El sitio de unión al receptor en la proteína S está parcialmente oculto en la conformación cerrada; en la forma abierta, por el contrario, dicho sitio de interacción queda expuesto y puede interactuar con el receptor ACE2, permitiendo la unión del virus a la membrana de la célula y facilitando finalmente la entrada del virus<sup>23,24</sup>. En la proteína S silvestre el porcentaje de protómeros que se encuentran en configuración abierta es del 18 % y cerrada 82 %, lo anterior favorecido por las interacciones que existen entre el aspartato 614 de S1 (D614) y la treonina 859 (T859) de S2, de esta manera el residuo D614 funciona como un interruptor a distancia (efecto alostérico) que mantiene mayoritariamente cerrada la proteína S limitando la interacción del RBD con el receptor ACE2<sup>25</sup>. (Figura 1.B)

## **Metodología**

Las secuencias analizadas registradas en la plataforma Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID por sus siglas en inglés)<sup>26</sup> fueron obtenidas a partir de eluidos de ARN de secreción nasofaríngea de pacientes positivos a la prueba de qRT-PCR para SARS-CoV-2, diagnosticados en el Laboratorio Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (INS) y la Sección de Virología y Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.

La secuenciación fue realizada en la Sección de Virología y Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, empleando el método de secuenciación con enfoque de amplicones. Se utilizó una variante

de reacciones de PCR multiplex de dos grupos con el kit de Paragon CleanPlex® SARS-CoV-2 by SOPHiA. Para la secuenciación se utilizó la plataforma MiniSeq Illumina según consta en los registros de GISAID para las secuencias de El Salvador.

Para la determinación de las variantes por mutaciones con sentido erróneo se utilizó la plataforma bioinformática SOPHiA-DDM-V5.7.10. Para la verificación de las mutaciones, las secuencias fueron analizadas en la plataforma GISAID27 y Nexclade beta v0.8.1. Los SNPs con sentido erróneo se tabularon asociados al gen afectado y el respectivo cambio de aminoácido. Obtenidos los SNPs se escogió la variante D614G encontrada en todas las secuencias que actualmente está siendo ampliamente estudiadas. Para ello se analizó mediante la visualización y comparación de la proteína S silvestre (D614: PDB ID: 6VXX) y de la variante mutada (D614G:PDB ID: 6XS6 ), que fueron descargadas del Protein Data Bank28 para el modelamiento y generación de imágenes de los detalles moleculares de las proteínas silvestre y mutada, se utilizó Pymol-v1.7.2.3.

El protocolo de investigación fue sometido y aprobado por el comité de ética local del Instituto Nacional de Salud. Las muestras fueron manejadas con un número de referencia para resguardar la identidad de las personas de las que procedían las muestras. Los datos de la secuenciación están disponibles en la plataforma GISAID bajo los siguientes registros: EPI\_ISL\_672570, EPI\_ISL\_672572, EPI\_ISL\_672573, EPI\_ISL\_671974, EPI\_ISL\_671978, EPI\_ISL\_672012.

## **Resultados**

Se analizaron los genes E, M, N, ORF10, ORF1a, ORF1ab, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, S, dentro de los cuales se identificaron un total de 27 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Desde 10 y hasta 15 mutaciones con sentido erróneo en cada una de las seis secuencias, algunos de los SNPs comunes entre las secuencias. Además, la mayoría de los SNP identificados fueron sin sentido (missense) implicando el cambio de aminoácido. Las secuencias, basadas en los



SNP identificados, se agruparon en un solo patrón variante, impulsada principalmente por SNP ubicados en la región S, NSP2, NS3 y gen S, presentando las mutaciones A23403G (SD614G), C1059T (NSP-2T265I) y G25563T (NS3Q57H). Se puede observar que la mutación D614G está presente en todas las secuencias. (Ver tabla 1)

## Discusión

Las seis secuencias aisladas de pacientes salvadoreños (Tabla 1) fueron clasificadas en el clado Nextstrain 20C, presentando las mutaciones A23403G (SD614G), C1059T (NSP2T265I) y G25563T (NS-3Q57H). Las variantes del SARS- CoV-2 con la mutación SD614G (clados GISAID G, GH y GR) en la proteína S predominan actualmente a nivel mundial<sup>29</sup>.

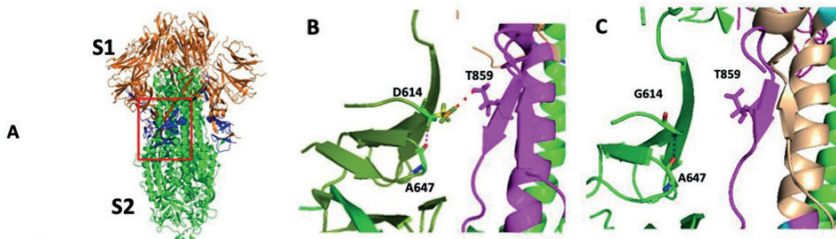
La mutación SD614G tiene dos consecuencias. Primero, el residuo G614 dificulta la formación de interacciones (puentes de hidrógeno) con la treonina 859 (T859) en S2, debilitando de esa manera la unión entre dos protómeros diferentes y reduciendo la compactación del trímero de proteína S.

Segundo, provoca la reducción de la distancia entre el residuo G614 y A647 dentro de cada protómero S, favoreciendo el estado abierto del dominio RBD25 (Figura 1.C). A diferencia de la variante SD614 cuyo porcentaje de protómeros en conformación abierta es del 18 %<sup>17</sup>, en la SG614 el 54 % de los protómeros se encuentran en conformación abierta encontrándose el dominio RBD más accesible para interactuar con el receptor ACE2<sup>25</sup>.

Los estudios con modelos celulares que expresan ACE2 mostraron que los viriones que llevan SG614 entran en células que expresan ACE2 más eficientemente que aquellos con SD614. Este aumento de la entrada se correlaciona con menos desprendimiento del dominio S1 y una mayor incorporación de proteína S en el virión. Por otro lado, las variantes no están relacionadas con el desarrollo de un cuadro clínico más severo<sup>30</sup>, ni afectan la potencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2<sup>31</sup>.

Tabla 1. Mutaciones con sentido erróneo encontradas

Identificación GISAID	EPI_ISL_672570	EPI_ISL_672572	EPI_ISL_672573	EPI_ISL_671974	EPI_ISL_671978	EPI_ISL_672012
S	D614G	D614G	D614G	A623S, D614G	D614G	D614G, S704L
N	R209K	R209K	R209K	R209K	R209K	P67S, P199L
NS3	P258S, Q57H	P258S, Q57H	P258S, Q57H	P258S, Q57H	P258S, Q57H	G172V, Q57H
NS7a	T39I	T39I	T39I	T39I	T39I	-
NS8	S24L, V62L	S24L	S24L	S24L	S24L	S24L
NSP2	T85I, T265I	T85I, T265I	S430L, T85I, T265I	T85I, T265I	T85I, T265I	T85I, T265I
NSP3	-	-	K384N	-	-	H727Y
NSP5	-	-	-	-	-	L89F
NSP9	-	-	S13F	-	-	-
NSP12	K59N, P323L	K59N, P323L	K59N, P323L	K59N, P323L	K59N, P323L	P323L
NSP13	-	-	-	L256F, N124S	L256F, N124S	-
NSP14	-	-	-	-	-	N129D
NSP15	-	-	-	-	-	V320L
NSP16	-	-	-	-	-	R216C

**Figura 1.** Estructura tridimensional de la proteína S de SARS-CoV-2

Este estudio abarca únicamente seis secuencias. Es necesario continuar la secuenciación de muestras representativas del país que permitan establecer la prevalencia de la misma y explicar la transmisibilidad, además del comportamiento de las variedades clínicas de la enfermedad que se han presentado en el país.

## Conclusiones

En El Salvador, el reporte de las primeras seis secuencias completas ha permitido clasificar los genomas en el clado 20C según Nextrain y el clado GH según GISAID, ubicándolos en los linajes pangolín B.1.2. y B.1.370, que son predominantes en EE.UU.

Las mutaciones detectadas en las secuencias aisladas en El Salvador afectan principalmente a los genes de las proteínas: S, N, NS3, NS7a, NS8, NSP2 y NSP12.

Al igual que a nivel mundial, los hallazgos confirman también el predominio de la variante D614G en este grupo de secuencias, que puede explicarse por la configuración de los sitios de unión con receptor ACE2, lo cual probablemente favorece su transmisibilidad.

Es necesario continuar con los estudios de secuenciación de genomas completos para confirmar de manera definitiva la prevalencia de la variante D614G en El Salvador y otras que puedan presentarse.

Por otro lado, también es necesario continuar atentos a las evidencias clínicas, de laboratorio y bioinformáticas que confirmen el papel de la mutación D614G en la infectividad y transmisibilidad de SARS-CoV-2. El análisis de las otras mutaciones encontradas será objeto de nuevas publicaciones que son necesarias para comprender el comportamiento epidemiológico y clínico de la enfermedad en el país, con el objeto de emprender estrategias para su abordaje integral, contribuir a la vigilancia genómica a nivel mundial y a generar información útil para el diseño de vacunas y fármacos blanco.

Se reconoce el apoyo de las máximas autoridades de la Universidad de El Salvador, Instituto Nacional de Salud y Ministerio de Salud.

Agradecimientos especiales a la Sección de Virología del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, y a la Sección de Virología del Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador.

## **Referencias bibliográficas**

1. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 2020;26(6):1266-1273. DOI:10.3201/EID2606.200516
2. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(10):929-936. doi:10.1056/nejmoa2001191
3. Gobierno de El Salvador. COVID-19 Reporte Diario. Gobierno de la Republica de El Salvador. 2021. Fecha de consulta: 21 de enero de 2021. Disponible en: [https:// covid19.gob.sv/diarios/](https://covid19.gob.sv/diarios/)

4. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
5. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490–502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
6. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *J. Virol.* 2012;86(7):3995–4008. doi:10.1128/jvi.06540-11
7. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 2020;92(4):418–423. doi:10.1002/jmv.25681
8. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019;17(3):181–192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9
9. Fung SY, Yuen KS, Ye ZW, Chan CP, Jin DY. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9(1):558–570. doi:10.1080/22221751.2020.1736644
10. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, O’Meara MJ, et al. A SARS-CoV-2-Human Protein-Protein Interaction Map Reveals Drug Targets and Potential Drug-Repurposing. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2020;(2020.03.22.002386). doi:https://doi.org/10.1101/2020.03.22.002386

11. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020;181(4):914-921. e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011
12. Park YJ, Walls AC, Wang Z, Sauer MM, Li W, Tortorici MA, et al. Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019;26(12):1151–1157. doi:10.1038/s41594-019-0334-7
13. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J. Virol.* 2003;77(16):8801–8811. doi:10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003
14. Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell. Mol. Immunol.* 2020;17(7):765–767. doi:10.1038/s41423-020-0374-2
15. Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Research.* 2020;178:104792. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104792
16. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260–1263. doi:10.1126/science.aax0902
17. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
18. Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycopro-

- tein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res.* 2017;27(1):119– 129. doi:10.1038/cr.2016.152
19. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallesen J, Yassine HM, Turner HL, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature.* 2016;531(7592):118– 121. doi:10.1038/nature17200
  20. Madu IG, Roth SL, Belouzard S, Whittaker GR. Characterization of a Highly Conserved Domain within the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein S2 Domain with Characteristics of a Viral Fusion Peptide. *J. Virol.* 2009;83(15):7411–7421. doi:10.1128/jvi.00079-09
  21. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research.* 2015;202:120–134. doi:10.1016/j.virusres.2014.11.021
  22. Park JE, Li K, Barlan A, Fehr AR, Perlman S, McCray PB, et al. Proteolytic processing of middle east respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(43):12262–12267. doi:10.1073/pnas.1608147113
  23. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;581(7807):221– 224. doi:10.1038/s41586-020-2179-y
  24. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS- CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020;367(6485):1444–1448. doi:10.1126/science.abb2762
  25. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, Wang Y, et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell.* 2020;183(3):739-751.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.09.032

26. GISAID - Initiative. Accessed August 23, 2020. <https://www.gisaid.org/>
27. GISAID - phylodynamics. Accessed December 22, 2020. Disponible en: [www.gisaid.org/epiflu-applications/phylodynamics/](http://www.gisaid.org/epiflu-applications/phylodynamics/)
28. Bank RPD. RCSB PDB: Homepage. Accessed December 22, 2020. <https://www.rcsb.org/>
29. Isabel S, Graña-Miraglia L, Gutierrez JM, Bundalovic-Torma C, Groves HE, Isabel MR, et al. Evolutionary and structural analyses of SARS-CoV-2 D614G spike protein mutation now documented worldwide. *Sci. Rep.* 2020;10(1):1–20. doi:10.1038/s41598-020-70827-z
30. Zhang L, Wang S, Ren Q, Yang J, Lu Y, Zhang L, et al. Genome-wide variations of SARS-CoV-2 infer evolution. *MedRxiv Prepr.* 2020:1–17. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081349>
31. Zhang L, Jackson CB, Mou H, Ojha A, Peng H, Quinlan BD, et al. SARS-CoV-2 spike- protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity



# Muestra de saliva para diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en población ambulatoria

DOI: 10.5377/alerta.v4i2.11476

Noé Rigoberto Rivera<sup>1</sup>

Orcid: 0000-0001-9553-0554

Carlos Alexander Ortega Pérez<sup>2\*</sup>

Orcid: 0000-0003-1612-8386

Xochitl Sandoval López<sup>3</sup>

Orcid: 0000-0002-0988-1313

Carlos Enrique Hernández Ávila<sup>4</sup>

Orcid: 0000-0002-1230-0102

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones Científicas, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, El Salvador C.A. <sup>2</sup>Sección de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, El Salvador C.A. <sup>3</sup>Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, El Salvador C.A. <sup>4</sup>Unidad de Gobernanza, Instituto Nacional de Salud, El Salvador C.A.

Recibido: 2 de mayo 2021

Aceptado: 20 de mayo 2021

Publicado: 1 de junio 2021

\*Correspondencia: carlos.ortega@ues.edu.sv

**Citación recomendada:** Rivera NR, Ortega CA, Sandoval López X, Hernández Ávila CE. Muestra de saliva para diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en población ambulatoria. Alerta. 2021;4(2):38-45. DOI 10.5377/alerta.v4i2.11476

**Contribución de autoría:** NRR1, CAOP2, XSL3, CEHA4. Escritura del manuscrito. NRR1, CAOP2, diseño del estudio, procesamiento de las muestras y análisis de los datos en las plataformas bioinformáticas.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés en el estudio ni haber recibido patrocinio de instituciones privadas.

## Resumen

**Introducción.** En El Salvador a la fecha, la técnica utilizada por el sistema nacional de salud para la obtención de la muestra para realizar PCR para SARS-CoV-2 es hisopado nasofaríngeo, diferentes investigadores han descrito la muestra de saliva como una muestra biológica útil para la detección de SARS-Cov-2, por esta razón se observa la oportunidad de aplicarla como una alternativa disponible para el diagnóstico de esta enfermedad.

**Objetivo.** Evaluar la autotoma de muestra de saliva y secreción nasofaríngea por pacientes no hospitalizados como una alternativa de menor riesgo biológico y de menor costo que los hisopados nasofaríngeos convencionales.

**Metodología.** Se procesaron las muestras de una mezcla de saliva y secreción faríngea obtenida por carraspeo autotomada por el paciente; la amplificación se realizó por RT-qPCR de los genes E y RdRp. Las muestras positivas se reevaluaron desde su extracción para confirmar la estabilidad de material genético de SARS-CoV-2 en la saliva y secreción nasofaríngea.

**Resultados.** El promedio de resultados positivos fue de 7,05 por cada 100 pruebas COVID-19 realizadas con hisopado, este resultado es similar al 8 % de positividad durante el mismo período de estudio utilizando como muestra saliva y secreción faríngea autotomada por el paciente. Las ocho muestras positivas mantuvieron su reactividad para los genes E y RdRp al primer, tercer y quinto mes posdiagnóstico inicial para los dos protocolos utilizados. De igual forma, los eluidos de ARN positivos iniciales se mantuvieron positivos al primer, tercer y quinto mes.

**Conclusión.** La muestra de saliva y secreción faríngea y su utilización para el diagnóstico de infección por SARS- CoV-2 podría ser una alternativa de bajo costo, no invasiva, al menos de igual utilidad que el hisopado nasofaríngeo para el estudio de población sintomática ambulatoria o con exposición a nivel comunitario.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, COVID-19, PCR, saliva

## Abstract

**Introduction.** Currently, the detection of SARS-CoV-2 cases in El Salvador has been carried out through RT-PCR by the nasopharyngeal swab sample. Researchers had described the saliva as a biological sample useful for detection of SARS- Cov-2, therefore an opportunity to use it as a feasible alternative for diagnostic.

**Objective.** To evaluate the self-supplied sample of saliva and nasopharyngeal secretion by non-hospitalized patients as an alternative of lower biological risk and less expensive to nasopharyngeal swab for the diagnosis of SARS-CoV-2.

**Methodology.** Patient samples that met the inclusion criteria were processed, amplification was carried out by two protocols already standardized by RT-qPCR of the E and RdRp genes, two of the positive samples by New Generation Sequencing (NSG) for confirmation diagnosis. Positive samples were re-evaluated from their extraction and amplification at the first, second, and fifth months after diagnosis to evaluate the stability of the SARS-CoV-2 genetic material in saliva and nasopharyngeal secretion.

**Results.** The average of positives per 100 tests in El Salvador in the month of November 2020 was approximately 7,05 for every 100 COVID-19 tests performed with swabs, this result is similar to the 8% positivity during the same month of the present study, using as sample a mixture of saliva and pharyngeal secretion self-taken by the patient. The eight positive samples maintained their positivity for the E and RdRp genes at the first, third, and fifth months after the initial diagnosis for both protocols. Similarly, the initial positive Ribonucleic Acid (RNA) eluates remained positive at the first, third, and fifth months.

**Conclusion.** The sample of saliva and pharyngeal secretion and its use for the diagnosis of infection by SARS-CoV-2 could be a low-cost, non-invasive alternative with the same utility as the nasopharyngeal

swab for the study of the symptomatic outpatient population or with a community level exposure. Likewise, it could be used for mass screening or sentinel surveillance in settings with limited resources.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, PCR, saliva, RdRp

## Introducción

De los coronavirus, dos virus altamente patógenos, Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV) y el Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) causan síndrome respiratorio severo en humanos y el SARS-CoV-2 causa la actual pandemia desde inicios del 2020<sup>1,2,3</sup>. Desde marzo de 2020 se reportan los casos de infección por SARS-CoV-2 en El Salvador<sup>4</sup>, utilizando RT-qPCR y como muestra, la secreción naso-faríngea recomendada en las orientaciones provisionales para pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2<sup>5</sup>. El 7 de marzo de 2021 el Ministerio de Salud reportaba 60 800 casos positivos y 1907 fallecidos<sup>4</sup> para esta misma fecha el Centro de Ciencia e Ingeniería de Sistemas (CSSE) de la Universidad Johns Hopkins reportaba a nivel mundial 116 822 839 casos y 2 593 073 fallecidos por SARS-CoV-2<sup>6</sup>. La Organización Mundial de la Salud reportó el 8 de marzo de 2021 que se habían aplicado 249 160 837 dosis de vacunas a nivel mundial<sup>7</sup>, se estima que entre el 60 % al 70 % de las personas necesitan ser inmunizadas para lograr inmunidad colectiva<sup>8-10</sup>. A pesar de la implementación del mecanismo COVAX la inmunidad colectiva no se logrará durante 2021<sup>11,12</sup>, por lo que es importante continuar con la vigilancia epidemiológica genómica mediante el diagnóstico molecular y secuenciación de SARS-CoV-2.

Los coronavirus son virus envueltos con un genoma ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 26-32 kilobases, forman partículas esféricas o pleomórficas envueltas de 100 a 160 nm de diámetro<sup>13</sup>. Su genoma codifica para 14 marcos de lectura abierto (ORF del inglés Open Reading Frame). En el extremo 5', los primeros son los ORF1a y ORF1ab que codifican para poliproteínas que se

procesan autoproteolíticamente en 16 proteínas no estructurales, este complejo replicasa-transcriptasa consta de múltiples enzimas. En el extremo 3' otros ORFs en el tercio distal del genoma codifican para al menos cuatro proteínas estructurales principales: proteína de espícula (S), glicoproteína de membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N), además nueve factores accesorios putativos<sup>14-17</sup>.

En una revisión sistemática se evaluaron un total de 67 pruebas de laboratorio diferentes utilizando la RT-qPCR como estándar de referencia, encontrándose una heterogeneidad considerable entre las pruebas, los valores de umbral y los contextos en que se aplicaron<sup>18</sup>. La RT-qPCR para el diagnóstico de COVID-19 se realiza con hisopos nasofaríngeos u otras muestras del tracto respiratorio superior, incluidos hisopos de garganta o, más recientemente, saliva. Se utiliza una variedad de objetivos dirigidos a uno o más genes de la envoltura (Env), nucleocápside (N), espícula (S), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y ORF1, la sensibilidad y capacidad de detección del SARS-CoV-2 varía dependiendo del gen amplificado<sup>20</sup>.

En la infección sintomática por COVID-19, el ARN viral en frotis nasofaríngeo medido por el umbral del ciclo (Ct) es detectable desde el día 1 de los síntomas y alcanza su máximo dentro de la primera semana del inicio de los síntomas<sup>19,21</sup>. La evolución temporal de la positividad y la seroconversión de la PCR puede variar en niños y otros grupos, incluida la gran población de individuos asintomáticos. La positividad de la RT-qPCR disminuye más lentamente en el esputo y aún puede ser positiva después que los hisopados nasofaríngeos sean negativos. En 205 pacientes con infección confirmada por COVID-19, la positividad fue más alta en las muestras de lavado broncoalveolar (93 %), seguida de esputo (72%), frotis nasal (63 %) y frotis faríngeo (32 %), la persistencia de la RT-qPCR positiva en el esputo y las heces fue similar<sup>19,22</sup>. En un ensayo de evaluación de la sensibilidad de la RT-qPCR se encontró mayor sensibilidad del gen E y del gen RdRp (5,2 y 3,8 copias por reacción respectivamente con una probabilidad de detección del 95 %). En el presente estudio la detección del gen N también dio resultados positivos, pero mostro menor sensibilidad<sup>20</sup>.

La toma del hisopado nasofaríngeo causa estornudos, tos y dolor nasofaríngeo en la mayoría de los casos, los pacientes generan gotitas o partículas de aerosol que son peligrosas para los trabajadores sanitarios que recogen estas muestras, esta exposición del personal sanitario dificulta la toma de muestras<sup>5</sup>.

Una alternativa no invasiva y confiable sería la detección de SARS-CoV-2 en saliva que se compara con las pruebas de hisopados convencionales, obteniendo resultados comparables entre las muestras<sup>23,24,25</sup>. Sin embargo la OMS insta a que antes de recurrir a otros métodos de obtención de muestras de líquidos respiratorios o bucales, el método de muestreo debe ser primero validado en el laboratorio para los grupos de pacientes previstos, recopilando sus propios datos de rendimiento en relación con el método local de recogida de muestras<sup>5</sup>.

En análisis de muestras emparejadas de saliva de garganta profunda e hisopado nasofaríngeo para diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR se encontró una tasa de detección de las muestras de saliva de garganta profunda de 53,7 % y de hisopado nasofaríngeo de 47,4 %, ambas muestras fueron comparables para detección del SARS-CoV-2<sup>23</sup>. Otra investigación sobre el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 mediante el uso de saliva demostró la capacidad de detectar el SARS-CoV-2 por RT-qPCR en la saliva almacenada a 4 °C durante un período de 1 semana, mostrándose que este método es útil para el diagnóstico del SARS-CoV-2<sup>26</sup>. En protocolos de amplificación isotérmica para la detección de SARS-CoV-2 para muestras de hisopos de nariz y garganta, se obtuvieron resultados comparables con el método estándar, logrando aplicar el mismo protocolo en la muestra de saliva con resultados comparables de los casos confirmados<sup>27</sup>.

La precisión diagnóstica en saliva es similar a la del hisopado nasofaríngeo con una sensibilidad combinada en saliva del 83,2 % y especificidad combinada del 99,2 %; con sensibilidad combinada para hisopado nasofaríngeo del 84,8 % y especificidad del 98,9 % en los análisis primarios. Los resultados fueron similares en los análisis secundarios, sugiriendo que la precisión diagnóstica en saliva es si-

milar con hisopado nasofaríngeo<sup>28</sup>. En otro estudio comparativo de saliva e hisopado nasofaríngeo y faríngeo estándar se encontró una sensibilidad y especificidad de la muestra de saliva para la RT-qPCR de 84,2 % (95 % CI 60,4 % - 96,6 %) y 98,9 % (95 % CI 96,1 % - 99,9 %), respectivamente. En el análisis de concordancia entre las dos muestras demostró una concordancia observada del 97,5 % (coeficiente  $\kappa$  0,851; IC del 95 %: 0,723-0,979;  $p < 0,001$ ), concluyendo que la saliva podría ser una muestra alternativa para el diagnóstico de COVID-19<sup>29</sup>.

Para analizar esta posibilidad diagnóstica un grupo investigador realizó un estudio en el Hospital Universitario de Keio (Tokio, Japón), se obtuvieron frotis nasofaríngeos y muestras de saliva, simultáneamente, de pacientes ingresados en tratamiento con COVID-19 y del personal universitario que presentaban síntomas que sugirieran infecciones virales agudas. Las muestras de hisopos nasofaríngeos fueron recolectadas por personal médico capacitado y las muestras de saliva fueron recolectadas por los propios pacientes. En general, las muestras de hisopos nasofaríngeos y de saliva mostraron una concordancia del 86,7 % con un coeficiente kappa de 0,625. Aunque las muestras recolectadas mucho después del inicio de los síntomas mostraron resultados discordantes, los obtenidos dentro de los 10 días desde el inicio de los síntomas ( $n = 140$ ) presentaron una concordancia del 96,4 % entre ambos tipos de muestras (coeficiente kappa: 0,883), indicando que la saliva, especialmente recolectada dentro de los 10 días posteriores al inicio de los síntomas, puede sustituir las muestras de frotis nasofaríngeos. El almacenamiento a largo plazo de las muestras de saliva en este estudio no afectó los resultados de la prueba incluso en presencia de ribonucleasa salival. Esto sugiere que las muestras de saliva recolectadas incluso en las casas de los pacientes pueden transportarse a laboratorios distantes sin perder sensibilidad. La fragmentación del ARN por ribonucleasa salival podría resultar en una pérdida de viabilidad, pero preservar la detectabilidad por sonda sin descomposición durante días incluso a 25 °C. Los valores del umbral del ciclo (CT del inglés Cycle Threshold) CT de las muestras de saliva no fluctuaron con el tiempo *ex vivo*<sup>30</sup>.

Las RT-qPCR para SARS-CoV-2 con saliva recolectada en una fase aguda son tan precisas como las que usan hisopado nasofaríngeo, y el almacenamiento de muestras de saliva a temperatura ambiente por varias horas, no afecta los resultados de la prueba. De igual forma se ha demostrado la posibilidad de análisis de grupos de muestras de saliva para cribados masivos<sup>30,31</sup>.

Para la muestra de saliva y secreción nasofaríngea deben evaluarse las posibles diferencias entre la saliva obtenida por saliva pasiva o materiales absorbentes y por carraspeo. La saliva de los pacientes infectados puede contener virus que pueden permitir la transmisión por el aire y también por gotitas orales y por lo tanto, debe manipularse con cuidado. Las ventajas de las muestras de saliva son: el paciente la recoge fácilmente, no requiere de personal especializado para su manejo reduciendo los riesgos biológicos, puede tomarse directamente en cualquier lugar requerido<sup>32,33</sup>.

Otro grupo investigador detectó más copias de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de saliva (logaritmo de copias promedio por mililitro de 5,58; intervalo de confianza del 95 %, 5,09 a 6,07) que en muestras de hisopado nasofaríngeo (media logarítmica de copias por mililitro, 4,93; IC del 95 %, 4,53 a 5,33). Además, un mayor porcentaje de muestras de saliva que las muestras de hisopos nasofaríngeos fueron positivas hasta 10 días después del diagnóstico de Covid-19. De 1 a 5 días después del diagnóstico, el 81 % (IC del 95 %, 71 a 96) de las muestras de saliva fueron positivas, en comparación con el 71 % (IC del 95 %, 67 a 94) de las muestras de hisopado nasofaríngeo. Los hallazgos sugieren que las muestras de saliva y las muestras de frotis nasofaríngeos tienen al menos una sensibilidad similar en la detección del SARS-CoV-2<sup>34</sup>.

## **Metodología**

Diseño del estudio exploratorio. Se incluyeron a mayores de 21 años con o sin antecedentes de fiebre o enfermedades respiratorias agudas, otros signos o síntomas compatibles con COVID-19 dentro



de los 14 días previos a la toma de muestra, historial de contacto con caso confirmado o sospechoso. Todo se sistematizó con lista de verificación de autollenado rápido.

El día de la recolección de la muestra se dieron recomendaciones a los participantes para que una hora antes de la toma no ingirieran alimentos sólidos, ni líquidos, excepto agua; no masticar golosinas o chicles, no fumar o utilizar vaporizador con o sin sabor; no utilizar algún tipo de spray bucal; no lavarse los dientes, ni utilizar enjuagues bucales o hilo dental y no utilizar productos cosméticos como lápiz labial, bálsamos o cremas labiales.

Se recolectaron 100 muestras de 2 ml como volumen mínimo de una mezcla de saliva y secreción faríngea por carraspeo autotomada por el paciente, utilizando tubos de polipropileno de 14 ml vacíos y estériles (sin medio de transporte), la recolección fue realizada en espacios abiertos con distanciamiento mayor a 5 metros entre cada persona. Las muestras recolectadas fueron trasladadas en termo hielera hacia el laboratorio.

Previo al procesamiento, las muestras se centrifugaron a 2000 RPM por 5 segundos y sin abrir los tubos se procedió a inactivar el virus a 65 °C por 30 minutos buscando una reducción mayor de 4 log del coronavirus infectante, esta temperatura se determinó de acuerdo a resultados de diversos estudios de inactivación de SARS-CoV-2 por temperatura<sup>35-37</sup>.

La extracción se realizó con el kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit Invitrogen de ThermoFisher Scientific®. Los eluidos fueron conservados a -80 °C después de la extracción. La concentración de ARN fue determinada por fluorometría con Quantus fluorometer, Promega® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó amplificación por RT-qPCR de los genes E y RdRp con dos protocolos: Charité, Berlin /EVAg, con la AgPath-ID One- Step RT-PCR de ThermoFisher Scientific® y con PowerChek 2019-nCoV Real-time PCR kit® (<https://www.fda.gov/media/140069/> down-

load). Las amplificaciones se realizaron en el QuantStudio 5 Real-Time PCR instrument de Applied Biosystems®.

Se consideraron como muestras positivas a SARS-CoV-2 si los valores de CT de los genes E y RdRp eran  $\leq 39$ , y negativo cuando los valores de CT de ambos objetivos eran  $> 39$ , siendo 39 el punto de corte. Se estableció que en las muestras con resultados de CT discordantes entre los genes investigados, por ejemplo, muestras con gen E con un valor de CT de  $\leq 39$  y gen RdRp con un valor de CT de  $> 39$  o viceversa, se repetiría el ensayo y si la discordancia persistía en esos valores de CT, estas se darían como negativas.

Las muestras positivas se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de  $250\text{ }\mu\text{L}$  para evaluar con el mismo protocolo de extracción y amplificación la viabilidad de positividad y mantenimiento o modificación del CT de las muestras al 1°, 3° y 5° mes posdiagnóstico inicial.

La toma y procesamiento de muestra, amplificación y análisis de resultados fueron realizados en el Laboratorio de Virología y Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.

De las muestras positivas se seleccionaron dos para ser secuenciadas por NGS en la plataforma MiniSeq Illumina con el kit de Paragon CleanPlex® SARS-CoV-2 by SOPHiA siguiendo el protocolo del fabricante. Para el alineamiento se utilizó la plataforma bioinformática SOPHiA-DDMV5.7.10.

Se cuenta con autorización del comité local de ética del Instituto Nacional de Salud. La base de datos codificada está bajo el resguardo de la Sección de Virología del Departamento de Microbiología, Universidad de El Salvador.

Las muestras obtuvieron una concentración de RNA por fluorometría entre  $50\text{ a }90\text{ ng}/\mu\text{L}$ , fueron 8 muestras positivas para el gen E y RdRp y 92 negativas para ambos genes. Tabla 1.

**Tabla 1.** Amplificación por RT-qPCR de muestras de saliva y secreción nasofaríngea

Volumen final con 5 µl de eluido	GEN E		GEN RdRp	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
25 µl, Charité, Berlin/evag 40 ciclos	8	92	8	92
20 µl, Powerchek 2019-ncov 40 ciclos	8	92	8	92

Las muestras positivas mostraron para el gen E y RdRp CT desde ciclo 18 hasta ciclo 35, el control positivo amplificó entre el ciclo 23 y 24 (Figura 1), todos los CT entre el gen E y RdRp fueron coincidentes, solo una de las muestras negativas mostró un CT no coincidente de 39 para el gen E en el protocolo PowerChek 2019-nCoV con CT no detectado para RdRp. Para esta misma muestra no se registró CT con protocolo Charité, Berlin / EVAg para ninguno de los genes, por lo que se catalogó como negativa.

Las muestras positivas y sus alícuotas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se extrajeron y amplificaron manteniendo su concentración de ARN, todas se amplificaron en un CT similar al inicial en los dos protocolos con los genes E y RdRp manteniendo su positividad al primero, tercero y quinto mes pos-extracción inicial. De igual forma los eluidos positivos iniciales almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se mantuvieron positivos al primero, tercero y quinto mes después del diagnóstico inicial.

Las dos secuencias obtenidas por NGS fueron positivas a SARS-CoV-2 en el análisis realizado en la plataforma SOPHiA-DD-MV5.7.10. y fueron validadas y depositadas para su posterior análisis en la plataforma GISAID con registro: EPI\_ISL\_671974, EPI\_ISL\_672573.

## Discusión

El promedio de positivos por cada 100 pruebas en noviembre en El Salvador fue de 7,05 por cada 100 pruebas para COVID-19 realizadas con hisopado nasofaríngeo<sup>4</sup>, este dato es similar con el resultados de ocho pruebas positivas de 100 pruebas realizadas durante el mes de noviembre en el presente estudio, utilizando como muestra una mezcla de saliva y secreción faríngea espontanea o por carraspeo autotomada por el paciente utilizando tubos de polipropileno de 14 ml vacíos y estériles (sin medio de transporte o SSN). Los protocolos de RT-qP- CR utilizados (Charité, Berlin /EVAg y Power- Chek 2019-nCoV) con los genes E y RdRp son los mismos utilizados en la mayoría de diagnósticos COVID-19 realizados por el Sistema Nacional de Salud, salvo por algunos equipos automatizados que utilizan gen N. Adicionalmente se reconfirmó por NGS la positividad de las muestras. Estos resultados son coincidentes y respaldan los hallazgos obtenidos en otros estudios en los que se demuestra que la saliva y esputo nasofaríngeo, especialmente si es recolectada dentro de los 10 días posteriores al inicio de los síntomas, puede sustituir las muestras de frotis nasofaríngeos<sup>30-32</sup> o que las muestras de saliva y las muestras de frotis nasofaríngeos tienen una sensibilidad similar en la detección del SARS-CoV-2<sup>34</sup>.

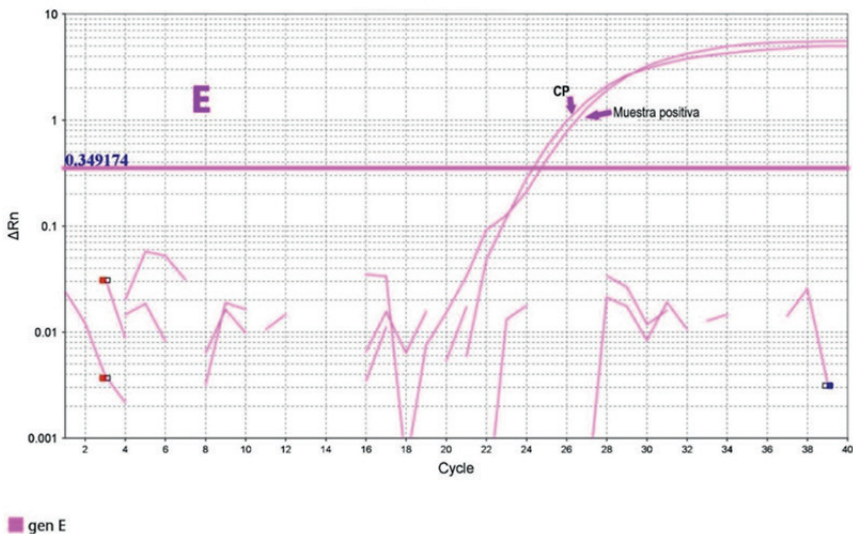
El almacenamiento a largo plazo de las muestras de saliva y secreción nasofaríngea a -80 °C no afectó los resultados de la prueba, incluso al 5° mes posdiagnóstico. Esto sugiere que las muestras de saliva y secreción nasofaríngea recolectadas de los pacientes, pueden almacenarse a -80 °C por meses sin perder sensibilidad lo que es coincidente con otros estudios<sup>30-32</sup>.

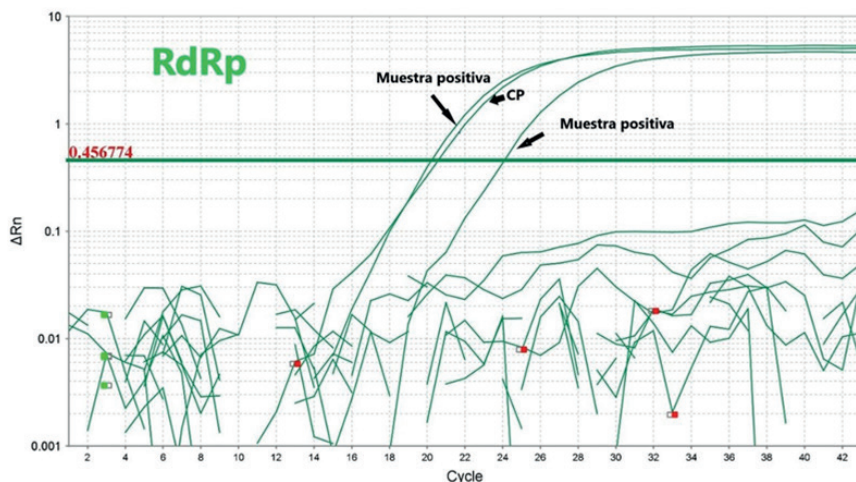
La autotoma de muestra de saliva tiene menor complejidad que la obtención del hisopado nasofaríngeo y esta técnica de autotoma de saliva requiere menor consumo de insumos y medidas de bioseguridad, solo se requiere abrir el tubo una sola ocasión para tomar los 200 µl de muestra para el proceso de extracción ya que al no utilizar hisopo se elimina este paso de manipulación, este proceso ejecutado para diagnostico COVID-19 demuestra al igual que en otros

estudios, que la saliva y secreción nasofaríngea autotomada por el paciente se convierte en una alternativa para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2<sup>31-33</sup>.

Si bien la concordancia de sensibilidad diagnóstica de las pruebas es alta, el tipo de muestreo de la población en estudio no permite una comparación estadística, debido a que no se realizó hisopado nasofaríngeo simultáneo a las personas que participaron en el estudio por ser un estudio exploratorio. A pesar que el tiempo y recursos invertidos fueron registrados por los investigadores, estos serán sistematizados en estudios posteriores comparando los dos métodos (saliva-secreción nasofaríngea versus hisopado nasofaríngeo). Es necesario realizar estudios de costo-efectividad que permitan adoptar otras metodologías de detección de SARS-CoV-2 y optimizar los recursos disponibles en nuestro país.

**Figura 1.** Curvas de amplificación de genes *E* y *RdRp*





## Conclusiones

La saliva y secreción nasofaríngea resulto efectiva para la detección de SARS-Cov-2 mediante la técnica de RT-qPCR a través de dos protocolos. Las medidas de bioseguridad para la toma de la muestra, como el distanciamiento y espacios ventilados son medidas de bioseguridad accesible para la mayoría de establecimientos de salud.

Las muestras positivas permanecieron viables para su diagnóstico hasta el quinto mes a  $-80^{\circ}\text{C}$  sin perder sensibilidad y especificidad.

La utilidad de la muestra de saliva y secreción faríngea autotomada emitida de manera espontánea o carraspeo para el diagnóstico COVID-19 es una alternativa de menor complejidad al no utilizar hisopo, tubos de transporte viral ni medios de conservación en el tubo. Es una medida no invasiva para el estudio de población sintomática ambulatoria o con exposición, útil para la detección de casos positivos a nivel comunitario, lugares de trabajo, escuelas y otros, reduciendo el riesgo del personal de salud que recolecta y procesa la muestra ya que no se expone a los aerosoles generados durante la toma de muestras con hisopo y se reduce la manipulación de la misma durante su análisis.

Se reconoce el apoyo de las autoridades de la Universidad de El Salvador, Instituto Nacional de Salud y Ministerio de Salud; agradecimientos especiales a la Sección de Virología del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador y a la Sección de Virología del Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador.

## Referencias bibliográficas

1. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502. DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.003
2. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *J Virol.* 2012;86(7):3995-4008. DOI: 10.1128/JVI.06540-11
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3
4. Gobierno de El Salvador. Situación Nacional COVID-19. Gobierno de El Salvador. 2021. Fecha de consulta: marzo de 2021. Disponible en: <https://covid19.gob.sv/>
5. Organización Mundial de la Salud. Pruebas diagnósticas para el SARS- CoV-2: orientaciones provisionales. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. 11 de septiembre de 2020. 26 p. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/335830>.
6. John Hopkins University Coronavirus Resource Center. COVID-19 dashboard by the Center for Systems Science and En-



- gineering (CSSE) at Johns Hopkins University. John Hopkins University. 2021. Fecha de consulta: marzo 2021. disponible en: [https:// www.arcgis.com/apps/dashboards/ bda7594740fd-40299423467b48e9ecf6](https://www.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd-40299423467b48e9ecf6)
7. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. World Health Organization. 2021. Switzerland. Fecha de consulta: marzo 2021. Disponible en: <https://covid19.who.int/>
  8. World Health Organization. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. WHO. 2021. Fecha de consulta: marzo 2021 Disponible en: [https://www.who.int/ publicaciones/m/item/draft-landscape-of- covid-19-candidate-vaccines](https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines)
  9. Randolph HE, Barreiro LB. Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2020;52(5):737-41. DOI: [https://doi. org/10.1016/j.immuni.2020.04.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012)
  10. ElBagoury M, Tolba MM, Nasser HA, Jabbar A, Hutchinson A. The find of COVID-19 vaccine: Challenges and opportunities. *J Infect Public Health*. 2020;14(3):389-416. DOI: [https://doi. org/10.1016/j.jiph.2020.12.025](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.12.025)
  11. World Health Organization. WHO concept for fair access and equitable allocation of COVID-19 health products. Geneva. WHO. 9 September 2020. 34 p. Disponible en: [https://www.who. int/publications/m/item/ fair-allocation-mechanism-for-co- vid-19- vaccines-through-the-covax-facility](https://www.who.int/publications/m/item/fair-allocation-mechanism-for-covid-19-vaccines-through-the-covax-facility)
  12. Herzog LM, Norheim OF, Emanuel EJ, McCoy MS. Covax must go beyond proportional allocation of covid vaccines to ensure fair and equitable access. *BMJ*. 2021;5;372:m4853. DOI: [10.1136/bmj.m4853](https://doi.org/10.1136/bmj.m4853).
  13. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol* . 2016;24(6):490-502. DOI:10.1016/j.tim.2016.03.003



14. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418-23. Disponible en: [https:// pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967327/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967327/)
15. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS- CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020;583(7816):459-68. DOI: 10.1002/ jmv.25681
16. Hernández Ávila CE, Ortega Pérez CA, Rivera NR, López XS. Análisis de la mutación D614G encontrada en secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador. *Alerta.* 2021;4(1):72-7. DOI: 10.5377/alerta. v4i1.10683
17. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* 2020;181(4):914-921. e10. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.011
18. Stegeman I, Ochodo EA, Guleid F, Holtman GA, Yang B, Davenport C, et al. Routine laboratory testing to determine if a patient has COVID-19 *Cochrane Infectious Diseases Group*, editor. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020;11:1465-1858. DOI:10.1002/14651858. CD013787
19. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS- CoV-2. *JAMA.* 2020;323(22):2249. DOI:10.1001/ jama.2020.8259
20. Reina J, Suarez L. Evaluation of different genes in the RT-PCR detection of SARS- CoV-2 in respiratory samples and its evolution in infection. *Rev. Esp. Quimioter.* 2020;33(4):292-293. DOI: 10.37201/ req/045.2020
21. Pinilla G, Cruz B CA, Navarrete O J. Diagnóstico molecular de SARS- CoV-2. *Nova.* 2020;18(35):35-41. DOI: 10.22490/24629448.4184

22. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-469. DOI: 10.1038/s41586-020-2196-x
23. Leung EC, Chow VC, Lee MK, Lai RW. Deep throat saliva as an alternative diagnostic specimen type for the detection of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2021;93(1):533-536. DOI: 10.1002/jmv.26258
24. Takeuchi Y, Furuchi M, Kamimoto A, Honda K, Matsumura H, Kobayashi R. Saliva-based PCR tests for SARS-CoV-2 detection. *J. Oral Sci.* 2020;62(3):350-351. DOI: 10.2334/josnusd.20-0267
25. Fakheran O, Dehghannejad M, Khademi A. Saliva as a diagnostic specimen for detection of SARS-CoV-2 in suspected patients: a scoping review. *Infect. Dis. Poverty*. 2020;9(1):100. DOI: 10.1186/s40249-020-00728-w
26. Williams E, Isles N, Chong B, Bond K, Yoga Y, Druce J, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva: implications for specimen transport and storage. *J. Med. Microbiol.* 2021;70(2). DOI:10.1099/jmm.0.001285
27. Ben-Assa N, Naddaf R, Gefen T, Capucha T, Hajjo H, Mandelbaum N, et al. Direct on-the-spot detection of SARS-CoV-2 in patients. *Exp. Biol. Med.* 2020;245(14):1187-1193. DOI: 10.1177/1535370220941819
28. Butler-Laporte G, Lawandi A, Schiller I, Yao M, Dendukuri N, McDonald EG, et al. Comparison of Saliva and Nasopharyngeal Swab Nucleic Acid Amplification Testing for Detection of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern. Med.* 2021;181(3):353. DOI: 10.1001/jamaintern-med.2020.8876
29. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Suksuwan W, et al. Saliva sample as a non-in-

- vasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021;27(2):285.e1-285.e4. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.001
30. Uwamino Y, Nagata M, Aoki W, Fujimori Y, Nakagawa T, Yokota H, S, et al. Accuracy and stability of saliva as a sample for reverse transcription PCR detection of SARS-CoV-2. *J. Clin. Pathol.* 2021;74(1):67-68. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206972
31. Pasomsub E, Watcharananan SP, Watthanachockchai T, Rakmanee K, Tassaneetrithep B, Kiertiburanakul S, et al. Saliva sample pooling for the detection of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2021;93(3):1506- 1511. DOI: 10.1002/jmv.26460
32. Ceron J, Lamy E, Martinez-Subiela S, Lopez- Jornet P, Capela-Silva F, Eckersall P, et al. Use of Saliva for Diagnosis and Monitoring the SARS-CoV-2: A General Perspective. *J. Clin. Med.* 2020;9(5):1491. DOI: 10.3390/jcm9051491
33. Azzi L, Maurino V, Baj A, Dani M, d'Aiuto A, Fasano M, et al. Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2. *J. Dent. Res.* 2021;100(2):115- 123. DOI: 10.1177/0022034520969670
34. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(13):1283-1286. DOI: 10.1056/NEJMc2016359
35. Kampf G, Voss A, Scheithauer S. Inactivation of coronaviruses by heat. *J Hosp Infect.* 2020;105(2):348-9. Available from: [https:// doi.org/10.1016/j.jhin.2020.03.025](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.03.025)
36. Rabenau HF, Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Preiser W, Doe-rr HW. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. 2005;194(1-2):1- 6. DOI: 10.1007/s00430-004-0219-0

# Origen del perfil de mutaciones presente en las secuencias de SARS-CoV-2 en El Salvador

## Origin of the mutation profile present in SARS-CoV-2 sequences in El Salvador

Carlos Alexander Ortega Pérez<sup>1</sup>      Orcid: 0000-0003-1612-8386  
Noé Rigoberto Rivera<sup>2</sup>              Orcid: 0000-0001-9553-0554  
Xochitl Sandoval López<sup>3</sup>          Orcid: 0000-0002-0988-1313  
Carlos Enrique Hernández Ávila<sup>4</sup>      Orcid: 0000-0002-1230-0102

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. [orcid.org/0000-0003-1612-8386](https://orcid.org/0000-0003-1612-8386). <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. [orcid.org/0000-0001-9553-0554](https://orcid.org/0000-0001-9553-0554). <sup>3</sup>Dirección, Instituto Nacional de Salud, El Salvador. [orcid.org/0000-0002-0988-1313](https://orcid.org/0000-0002-0988-1313) <sup>4</sup>Departamento de Gobernanza, Instituto Nacional de Salud, El Salvador. [orcid.org/0000-0002-1230-0102](https://orcid.org/0000-0002-1230-0102).

<https://doi.org/10.5377/revminerva.v5i2.15799>

Correspondencia: [noe.rivera@ues.edu.sv](mailto:noe.rivera@ues.edu.sv)

Presentado: 08 de diciembre de 2021

Aceptado: 23 de febrero de 2022

### Resumen

**Introducción:** en el presente trabajo se describe el perfil de mutación y se analizan los distintos mecanismos responsables de las mutaciones en las primeras 6 secuencias completas del genoma de SARS-CoV-2 a partir de muestras de pacientes salvadoreños con diagnóstico de COVID-19.

**Objetivo:** analizar el perfil de mutaciones de acuerdo a los mecanismos que dan origen a las mutaciones presentes en SARS-CoV-2.

**Metodología:** se realizó un análisis de los cambios en las secuencias del genoma de SARS-CoV-2 utilizando como referencia la secuencia Wuhan (NC\_045512.2), una vez conocidas las mutaciones, se procedió a tabular y generar gráficos de los SNPs y los genes afectados, además se analizaron los posibles mecanismos descritos responsables de generar las mutaciones estudiadas.

**Resultados:** el análisis reveló que las mutaciones encontradas han sido reportadas a nivel mundial, sin embargo, las secuencias presentan mayor semejanza con los cambios descritos en Norteamérica, sumado a ello, el análisis global permitió clasificarlas en el caldo GISAID GH, y linaje pangolín B.1.2 y B.1.370, ambos linajes con una alta prevalencia en EUA, lo cual refuerza la hipótesis del origen norteamericano de las secuencias salvadoreñas. El patrón de cambios del genoma de SARS-CoV-2 en El Salvador, sugiere que las mutaciones son debidas a la acción de las desaminasas APOBEC (transición C>T) y ADARs (transición A>G), al efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS) (transversión G>T), a errores propios del complejo replicación transcripción (RTC) que escapan a la corrección de la actividad exonucleasa de NSP14 y finalmente mutaciones como resultado de mecanismos de recombinación.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, D614G, NGS, 2019- nCoV, COVID-19s

## Abstract

**Introduction:** this paper describes the mutation profile and analyzes the different mechanisms responsible for mutations in the first 6 complete sequences of the SARS-CoV-2 genome from samples of Salvadoran patients diagnosed with COVID-19.

**Objective:** to analyze the mutation profile according to the mechanisms that give rise to the mutations present in SARS-CoV-2.

**Methodology:** an analysis of the changes in the genome sequences of SARS-CoV-2 was performed using as reference the Wuhan sequence (NC\_045512.2), once the mutations were known, we proceeded to tabulate and generate graphs of the SNPs and affected genes. The possible described mechanisms responsible for generating the mutations studied were also analyzed.

**Results:** the analysis revealed that the mutations found have been reported worldwide, however, the sequences present greater

similarity with the changes described in North America, added to this, the global analysis allowed classifying them in the GISAID GH broth, and pangolin lineage B.1.2 and B.1.370, both lineages with a high prevalence in the USA, which reinforces the hypothesis of the North American origin of the Salvadoran sequences. The pattern of changes in the SARS-CoV-2 genome in El Salvador suggests that the mutations are due to the action of APOBEC deaminase (C>T transition) and ADARs (A>G transition), to the effect of reactive oxygen species (ROS) (G>T transversion), to errors in the replication transcription complex (RTC) that escape the correction of the exonuclease activity of NSP14 and finally mutations as a result of recombination mechanisms.

**Key words:** SARS-CoV-2, D614G, NGS, 2019-nCoV, COVID-19s

## Introducción

El primer lugar en el que se identificó oficialmente el SARSCoV-2 fue en un mercado de mariscos en la ciudad de Wuhan, China, en el que existían las condiciones para la transmisión de patógenos de animales salvajes a humanos (Zhu et al., 2020) (Huang et al., 2020). La secuenciación completa del genoma permitió clasificar a SARS-CoV-2, como un nuevo virus dentro del género Betacoronavirus, de la subfamilia Coronavirinae, junto con SARS-CoV y MERS-CoV, con quienes comparte respectivamente el 79 y 50 % de similitud genómica (Gorbalenya et al., 2020) (Lu et al., 2020) (Zhou et al., 2020). Inicialmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo denominó nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) y, posteriormente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus lo denominó como Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2) (Gorbalenya et al., 2020).

## Genoma de SARS-CoV-2

El genoma de SARS-CoV-2 está formado por una única cadena de ARN (ácido ribonucleico) monocatenario de polaridad positi-

va (+ssARN) de 29.82 kb, que codifica para 14 marcos de lectura abiertos. La cadena de ARN se asemeja, estructuralmente a un ARN mensajero (ARNm) de células eucarióticas, ya que, presenta un capuchón metilado en el extremo 5' (5' cap) y una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3' (Chen et al., 2020).

En el extremo 5' se encuentran los ORF1a y ORF1ab, estos se traducen en poliproteínas que se dividen en proteínas no estructurales (NSP) que forman el complejo replicación-transcripción (RTC) que consta de múltiples enzimas, incluida la proteasa similar a la papaína (NSP3), la proteasa principal (NSP5), el complejo primasa NSP7-NSP8, la ARN polimerasa dependiente de ARN de baja fidelidad o RdRp (NSP12), una helicasa trifosfatasa (NSP13), una exoribonucleasa (NSP14), una endonucleasa (NSP15), N7- y 2' O- metiltransferasa (NSP10 y NSP16), respectivamente. En el extremo 3' otros ORFs codifican para al menos cuatro proteínas estructurales principales: proteína de espícula (S), glicoproteína de membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) (Chen et al., 2020) (Perlman & Netland, 2009).

## El complejo replicación-transcripción

La replicación y la transcripción de los coronavirus ocurren en el citoplasma de las células infectadas y están mediados por el complejo replicación-transcripción (RTC). Dicho complejo se asocia con endosomas derivados del retículo endoplásmico rugoso que finalmente se convierten en “estructuras” virales de replicación (Snijder et al., 2020). El anclaje del RTC a la membrana es mediado por NSP3 junto con proteínas transmembrana NSP4 y NSP6 (Angelini et al., 2013). Las proteínas virales consideradas como el centro del complejo RTC son la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp; gen NSP12), la helicasa NSP13 y los factores de procesividad NSP7 y NSP8 (Sola et al., 2015).

## Replicación y transcripción del genoma de SARS-CoV-2

Igual que otros virus ARN de hebra con sentido positivo, la replicación del genoma de los coronavirus incluye la síntesis de una hebra de ARN complementaria con sentido negativo que sir-

ve de molde complementario de tamaño completo para la subsiguiente copia del template en múltiples genomas con sentido positivo. La replicación está mediada por NSP12 o ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) junto con otras enzimas replicativas codificadas por ORF1b que forman el complejo replicación transcripción (RTC) (Subissi et al., 2014). Existe evidencia que tanto el extremo 5' como el 3' del ARN genómico son indispensables para la producción de las hebras hijas de ARN con sentido positivo a partir del molde de ARN hebra negativa, lo anterior indica que la interacción de los extremos 5' y 3' del genoma contribuyen a la replicación (Sola et al., 2011). La replicación del ARN comienza con la unión de la RdRp al extremo 3' de la hebra de ARN de sentido negativo, a estructuras secundarias de ARN y a secuencias específicas del genoma molde (Sola et al., 2015).

### **Transcripción del genoma viral**

La transcripción de la región proximal al extremo 3' y los genes codificantes de proteínas accesorias es un proceso discontinuo que resulta en la producción de un set de mRNA subgenómico (sg-mRNA). Los sg-mRNA de coronavirus poseen una secuencia líder en el extremo 5' de cada genoma viral fusionado al extremo 5' de cada mRNA producido en la transcripción. Secuencias reguladoras de transcripción (TRSs) localizadas en el extremo 3' de las secuencias líder (TRS; líder) y las TRS de cada gen (TRS-B; cuerpo) poseen secuencias complementarias que hibridan durante la transcripción y promueven la unión de las "TRS líder" y las "TRS cuerpo", la presencia de la secuencias líder en cada transcrito protege a las moléculas de mRNA viral de ser degradadas por la proteína NSP1 que promueve la degradación del mRNA del hospedador (Sola et al., 2015).

### **Mecanismos de corrección genética en coronavirus**

Los coronavirus y otros del orden nidoviridae poseen los genomas ARN más grandes y complejos conocidos (Saberri et al., 2018). La replicación de virus ARN típicamente presenta una alta tasa de error (o baja fidelidad) lo cual resulta en la existencia de una diversa



población de genomas mutantes o “cuasiespecies” (Kuljić-Kapulica & Budisin, 1992). Si bien la baja fidelidad de la replicación permite a los virus ARN adaptarse y superar la presión de selección en diferentes entornos, también incrementa la posibilidad de errores catastróficos que conlleven a la extinción viral. Lo anterior sugiere la necesidad de un equilibrio finamente ajustado entre la diversidad de las “cuasiespecies” y la tendencia hacia mutaciones que proporcionen mayor ventaja evolutiva y virulencia (Smith & Denison, 2012). La proteína NSP14 está altamente conservada entre los coronavirus, ya que su actividad exonucleasa correctora de errores es fundamental para la estabilidad y conservación de su complejo e inusualmente largo genoma (Gorbalenya et al., 2006). La proteína NSP14 es una enzima bifuncional con un dominio N-terminal exonucleasa (ExoN) implicado en la fidelidad de la replicación y un dominio C-terminal con actividad N-metiltransferasa (N7-MTasa) implicado en la protección del mRNA viral a través de la incorporación de un capuchón metilado en el extremo 5' (5'cap) del ARN (Chen et al., 2009). Además, NSP14 está implicada en muchos procesos del ciclo de vida viral y patogenicidad, incluyendo la respuesta inmune innata y la recombinación del genoma viral (Becares et al., 2016). El dominio N7-Metiltransferasa de NSP14 o dominio C-terminal N7-MTasa contiene un motivo de unión a D<sub>x</sub>G S-adenosil-L-metionina (SAM), este motivo es conservado entre los coronavirus y está implicado en la protección del mRNA y la evasión de la respuesta inmune. Las mutaciones en el motivo de unión a D<sub>x</sub>G S-adenosil-L-metionina (SAM) de NSP14 de SARS-CoV-2 (mutación G333A) eliminan la actividad N7-MTasa afectan la replicación sin alterar la actividad ExoN (Case et al., 2016).

La actividad exonucleasa de NSP 14 reside en el extremo o dominio N-terminal (Chen et al., 2009). El dominio ExoN corrige los errores de la RdRp al remover los nucleótidos erróneamente apareados en el extremo 3' de la hebra de ARN en crecimiento (Ferron et al., 2017). Además, reportes recientes demuestran que el dominio ExoN de NSP14 juega un rol en la frecuencia de recombinación de sgRNA y el patrón de recombinación en células infectadas y viriones. La inactivación del dominio ExoN en NSP14 conlleva a una disminución de sgRNA e incremento de genomas virales defectuosos (DVGs) (Gribble et al., 2021).

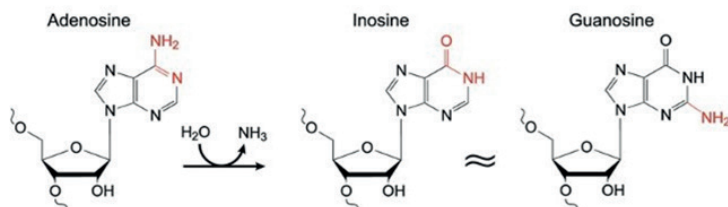
## Variación genética de SARS-CoV-2

Los virus son parásitos intracelulares estrictos, debido a ello los organismos han desarrollado mecanismos especializados en la detección y control viral (mecanismos de restricción viral). Entre los mecanismos de restricción viral encontramos la edición de ARN y ADN mediado por desaminasas endógenas que proveen una potente defensa contra virus específicos. Dos desaminasas están presentes en células de mamíferos: ADARs (ARN de doble cadena específicos de adenosina desaminasas) que actúan sobre ARN de doble cadena (dsARN) desaminando adeninas y generando inosina (A>I) que finalmente culmina en el cambio permanente A > G (Figura 1) (Eisenberg & Levanon, 2018) y APOBEC (Harris & Dudley, 2015) que desaminan citosinas a uracilo (C>U; C>T en ADN) en ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssADN y ssARN) (Salter & Smith, 2018).

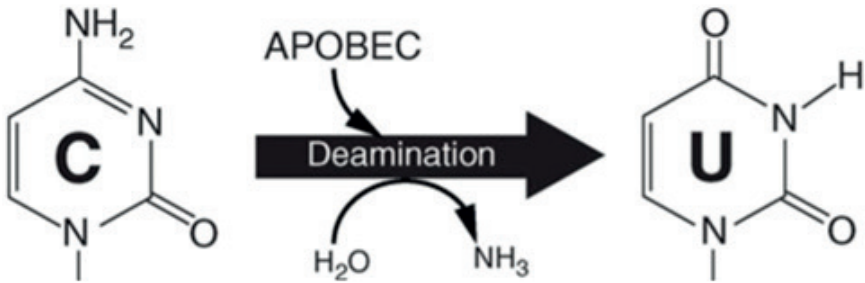
Durante la infección viral ADARs actúan directamente a través de la hipermutación del ARN viral o indirectamente a través de la edición de transcritos que modulan la respuesta celular (Taylor et al., 2005) (Zahn et al., 2007).

Se han reportado evidencias que ambos mecanismos de restricción viral (ADARs y APOBEC) están implicados en la edición del genoma de coronavirus, procesos que están implicados en la mutagénesis viral (Di Giorgio et al., 2020). APOBECs actúa sobre el genoma viral, ya sea a través de la hipermutación C>U (Figura 2) o a través de una vía no enzimática que interfiere con la transcripción inversa (Pollpeter et al., 2018).

**Figura 1.** Generación de guanosina por acción de las desaminasas ADARs sobre el genoma viral.



**Figura 2.** Generación de uracilo por acción de las desaminasas APOEC sobre el genoma viral.



Otro mecanismo indirectamente implicado en la mutagénesis es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionada con la actividad de APOBEC. ROS induce daño oxidativo de ácidos nucleicos transformando guanina en oxoguanina, esta última se aparea con adenina y conlleva a la sustitución G> U (G>T en ADN) (Niocel et al., 2019).

Un mecanismo no menos importante que los anteriores es la recombinación, que constituye una característica importante y particular del proceso evolutivo de los Coronavirus, resultados de algunos estudios han revelado una naturaleza en mosaico de la glicoproteína SARS-CoV-2 S que se le había restado importancia previamente, sin embargo, la evidencia indica que ocurrieron varios eventos de recombinación, involucrando linajes ancestrales Pangolin-CoV-2019, Bat-CoV-RaTG13 y Bat-CoV-RmYN02; a pesar de lo anterior, el muestreo limitado de Coronavirus en la vida silvestre puede complicar la inferencia definitiva del linaje parental de cada fragmento, incluso para segmentos genéticos como el RBD, donde existe una gran similitud entre Pangolin-CoV-2019 y SARS-CoV-2. Uno de estos eventos de recombinación condujo a la adquisición de los residuos de unión a ACE2 que se encuentran en el linaje SARS-CoV-2 que circula actualmente en El Salvador, la nueva escisión similar a la furina en la unión S1 / S2 también se encuentra dentro de uno de los posibles fragmentos de recombinación, esta característica de SARS-CoV-2 no estaba presente en los otros Coronavirus estrechamente relacionados o en los SARS-CoV que circulaban anteriormente (Tagliamonte et al., 2021).

A la fecha han sido publicadas en GISAID 818,874 secuencias de genomas completos de SARS-CoV-2 (18/03/2021). A medida que más secuencias completas del genoma de SARS-CoV-2 se encuentran disponibles en las plataformas virtuales (GISAID, Nextrain y otras), se va definiendo un patrón genético que permitirá establecer una relación directa entre el patrón de las mutaciones en el genoma de SARS-CoV-2 con regiones geográficas específicas (Mercatelli & Giorgi, 2020). El 22 de enero de 2021 se publican las primeras 6 secuencias del genoma de SARS-CoV-2 en El Salvador (números de Identificación GISAID EPI\_ISL\_672570, EPI\_ISL\_672572, EPI\_ISL\_672573, EPI\_ISL\_671974, EPI\_ISL\_671978 y EPI\_ISL\_672012) (Hernández Ávila et al., 2021).

Por otro lado, aún no está 100 % clara la base que explique las diferencias en virulencia, patogenicidad y mortalidad observados en diferentes países; todo indica que el análisis de más datos epidemiológicos y variación genómica permitirán conocer la razón de dichas diferencias (Brufsky, 2020). La información aportada por el análisis genómico, permitirá orientar el manejo farmacológico y eficacia de las vacunas (Wu et al., 2020) y permitirá diseñar y aplicar estrategias de prevención y vigilancia epidemiológica más objetivas y eficientes (Zhao & Chen, 2020).

## **Metodología**

Para la determinación de las variantes por mutaciones con sentido erróneo y sinónimas se utilizó la plataforma bioinformática SOPHiA-DDMV5.7.10. En la verificación de las mutaciones, las secuencias fueron analizadas en la plataforma GISAID y Nexclade beta v0.8.1. Una vez obtenidos los informes de las mutaciones, se procedió a tabular y generar gráficos de los SNPs asociados al gen afectado y el respectivo cambio de aminoácido.

El protocolo de investigación fue sometido y aprobado por el Comité Local de Ética del INS; los investigadores no tuvieron acceso a la identidad de los pacientes u otros datos sensibles. Las

muestras fueron manejadas por un número de referencia. Los datos de la secuenciación están disponibles en la plataforma GISAID bajo los siguientes registros: EPI\_ISL\_671974, EPI\_ISL\_671978, EPI\_ISL\_672012, EPI\_ISL\_672570, EPI\_ISL\_672572, EPI\_ISL\_672573.

## Resultados

Se analizaron las alteraciones genéticas presentes en 6 secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 reportadas en El Salvador (Hernández Ávila et al., 2021), las cuales están disponibles en GISAID.

Los resultados reflejan un total de 48 mutaciones diferentes al compararlas con el genoma de referencia Wuhan (NC\_045512.2). Entre las más frecuentes, 7 mutaciones están presente en todas las secuencias analizadas (A23403G, C14408T, C3037T, C241T, G25563T, C1059T, C27964T) y 4 están presente en 5 secuencias (C26164T, G13617T, C27509T, G28899A), el resto de mutaciones únicamente está presente en una secuencia (Figura 3).

7 mutaciones están presente en todas las secuencias analizadas (A23403G, C14408T, C3037T, C241T, G25563T, C1059T, C27964T) y 4 están presente en 5 secuencias (C26164T, G13617T, C27509T, G28899A), otras mutaciones se encuentran en 2 y otras en 1 secuencia.

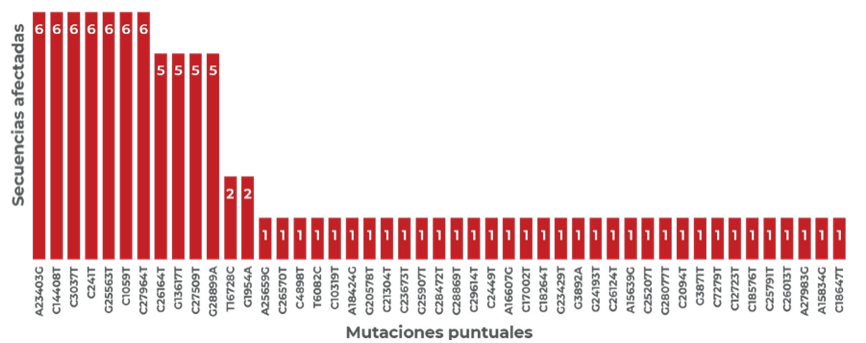
Únicamente se han encontrado cambios debido a polimorfismo de nucleótido simple (SNPs); no se evidenciaron inserciones ni deleciones. El 56.25 % (27 diferentes mutaciones) provocan cambios en la secuencia de las proteínas (mutaciones con sentido erróneo), el 44.75 % (21 mutaciones) no generan cambios (mutaciones silenciosas) y el 2.08 % (1 mutación) se encuentran en la región reguladora 5'UTR (Figura 4).

En las secuencias analizadas, se detectaron 48 mutaciones, de las cuales el 56.25 % (27 cambios) son SNPs con sentido erróneo, 43.75

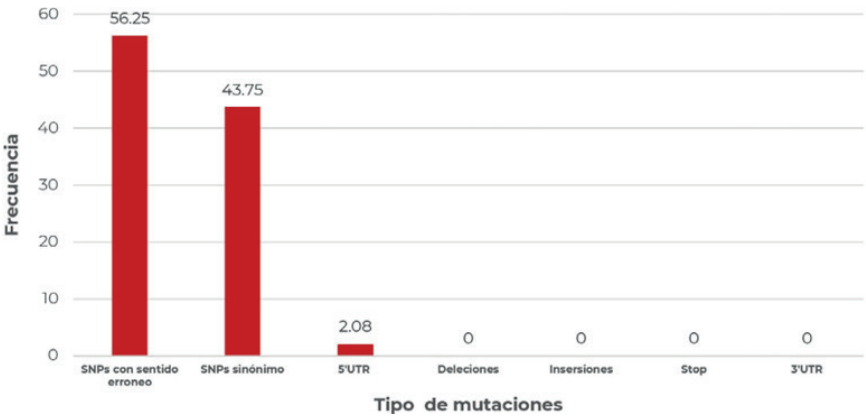
% (21 cambios) son mutaciones silenciosas. El 2.05 % ocurren en la región 5'UTR, no se encontraron mutaciones en el extremo 3'UTR, delección ni inserciones. Las diferentes secuencias presentan un rango entre 15 y 19 mutaciones, mostrando un promedio de 16.7 % mutaciones por secuencia (Figura 5).

Se reportan entre 15 y 19 mutaciones por aislado. El promedio de mutaciones por aislado es 16.7.

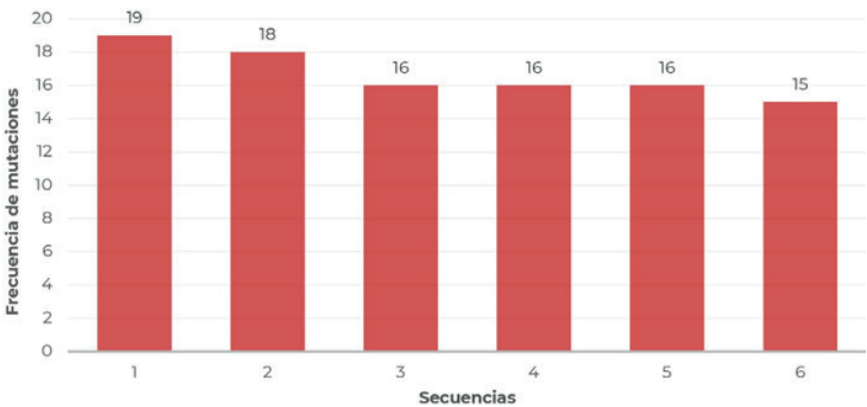
**Figura 3.** Mutaciones reportadas a nivel de ácidos nucleicos en el genoma de SARS-CoV-2 en El Salvador



**Figura 4.** Tipos de mutaciones encontradas en las secuencias de SARS-CoV-2 de El Salvador

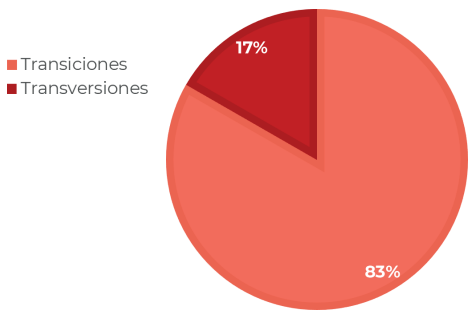


**Figura 5.** *Número de mutaciones por secuencia*



Las transiciones representan el 83 % del total de mutaciones encontradas, mientras que las transversiones el 17 %. La única transversión encontrada es la sustitución G>T (Figura 6).

**Figura 6.** *Tipos de sustituciones presentes en las secuencias analizadas.*



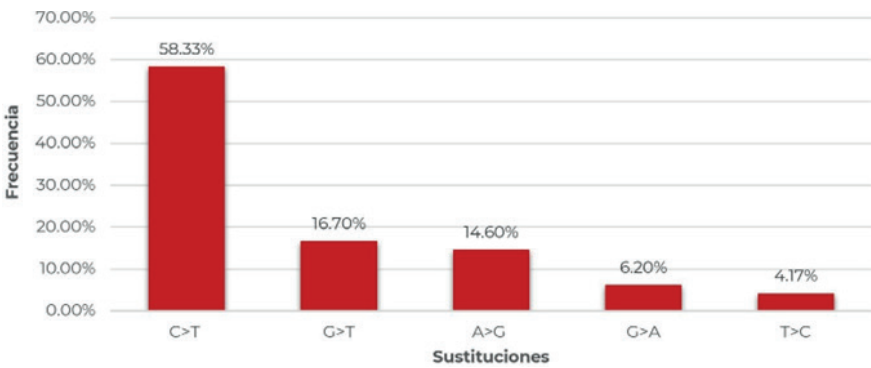
Predominan las transiciones (83 %) sobre transversiones (17 %).

De mayor a menor porcentaje las sustituciones encontradas son C>T (58.3 %), G>T (16.7 %), A>G (14.6 %), G>A (6,2 %) y T>C (4.17 %) (Figura 7).

Los genes afectados con mayor número de mutaciones con sentido erróneo (3 cambios) son, S (D614G, A623S y S704L), NS3 (P258S, Q57H y G172V), NSP2 (S430L, T85I, T265) y N (N R209K, N P67S, NP199L); \con 2 mutaciones los genes NS8, NSP12, NSP3 y NSP13 y con una mutación los genes NSP5, NSP9, NSP15 y NS7a (Figura 8).

Entre las mutaciones con sentido erróneo 6 (S D614G, NS8 S24L, NS3 Q57H, NSP2 T85I, NSP2 T265I, NSP12 P323L) están presentes en el 100 % de las secuencias (6 de 6 aislados); 4 mutaciones (NS7a T39I, NSP12 K59N, N R209K y NS3 P258S) están presentes en el 83.3 % de las muestras (5 de 6) y otras mutaciones se encuentran únicamente en una (Figura 9). En ninguna de las secuencias se observaron mutaciones propias de las variantes del Reino Unido, Sudáfrica, Brasil y California que presentan mayor transmisibilidad e infectividad.

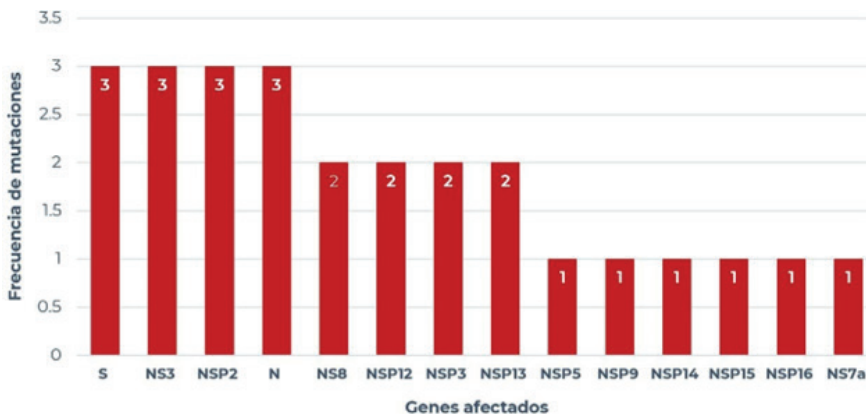
**Figura 7.** *Tipos de sustituciones encontradas en los genomas analizados*



*Nota.* Existe un predominio de transiciones sobre transversiones. Entre las transiciones el cambio C>T representa el 58.33 % de todos los cambios encontrados. Únicamente se encontró la transversión G>T.

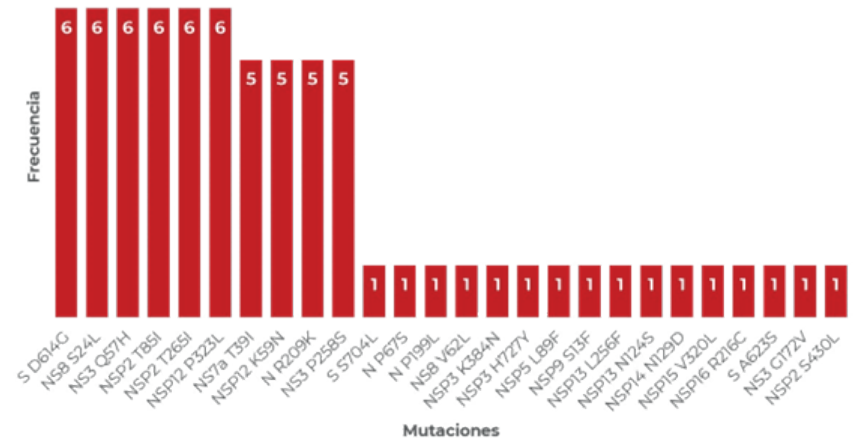


Figura 8. Genes afectados por mutaciones



Nota. Los genes afectados con mayor número de mutaciones con sentido erróneo son el gen S (D614G, A623S y S704L), NS3 (P258S, Q57H y G172V) y NSP2 (S430L, T85I, T265) y N (R209K, P67S y P199L). Con 2 mutaciones los genes NS8, NSP12, NSP3 y NSP13 y con una mutación los genes NSP5, NSP9, NSP15 y NS7a.

Figura 9. Frecuencia de mutaciones con sentido erróneo encontradas en las secuencias publicadas en El Salvador



Nota. 6 mutaciones (S D614G, NS8 S24L, NS3 Q57H, NSP2 T85I, NSP2 T265I y NSP12 P323L) están presente en el 100 % de los aislados (6 de 6 aislados); 4 mu-

taciones (NS7a T39I, NSP12 K59N, N R209K y NS3 P258S) están presente en el 83.3 % de las muestras (5 de 6) y otras mutaciones se encuentran únicamente en una muestra.

## **Discusión**

A nivel mundial se ha encontrado un promedio de 7.23 mutaciones por secuencia (Mercatelli & Giorgi, 2020); en El Salvador el promedio es de 16.7 mutaciones por secuencia. En relación a las mutaciones en regiones codificantes, es semejante a lo reportado a nivel global, ya que en El Salvador predominan los SNPs con sentido erróneo (55.3 %) sobre las mutaciones sinónimas (44.68 %). En El Salvador las regiones reguladoras presentan la mutación 5'UTR 241C>T, dicha mutación también está presente en el 100 % de las secuencias analizadas a nivel mundial. Actualmente, se está acumulando evidencia sobre el efecto de la mutación 5'UTR 241C>T sobre la replicación, la transcripción y el plegamiento de los ssRNA virales, lo cual continúa en estudio (Sola et al., 2011) and the transcription of sgRNAs by a discontinuous mechanism. Both processes are regulated by RNA sequences such as the 5' and 3' untranslated regions (UTRs. En las 6 secuencias analizadas no se evidencia ninguna delección, inserción, o codones de parada reportadas en otras regiones.

El perfil de sustitución de El Salvador es semejante al encontrado a nivel mundial; muestra un predominio de las transiciones (Alouane et al., 2020), en particular las transiciones C>T (58.3 %) y A>G (14.6 %). En el caso de las transversiones, solo se detectó el cambio G>T (16.7 %).

Este patrón de cambios en el genoma de SARS-CoV-2 en El Salvador, sugiere que el origen de las mutaciones observadas en las secuencias de El Salvador incluye los errores propios del complejo replicación transcripción (RTC) que escapan a la corrección de la actividad exonucleasa de NSP14 (Ferron et al., 2017) y mayoritariamente a la participación de los mecanismos de restricción viral del sistema inmune humano, mediado por las desaminasas APOBEC

(Harris & Dudley, 2015) que desaminan citosinas a uracilo y se refleja en el ADN como el cambio C>T, ADARs que desamina adeninas y finalmente culmina en el cambio permanente A > G (Eisenberg & Levanon, 2018) y a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionada con la actividad de APOBEC, la cual induce daño oxidativo de ácidos nucleicos que conlleva a la transversión G> U (G>T en ADN) (Niocel et al., 2019).

A pesar de que la mayoría de las mutaciones encontradas en El Salvador han sido reportadas en todo el mundo, la proporción de cada uno de los cambios a nivel de ácidos nucleicos, los genes más afectados y las mutaciones con sentido erróneo, indica que el patrón de mutaciones en las secuencias de El Salvador tiene mayor semejanza con las secuencias publicadas en Norteamérica, lo que sugiere que fueron importadas de dicha región. Por otro lado, al analizar las 6 secuencias en las plataformas virtuales Nextstrain y GISAID todas fueron clasificadas en el clado Nextstrain 20C, caracterizado por la mutación A23403G, C1059T y G25563T y según GISAID pertenecen al clado GH, linaje pangolín B.1.2 y B.1.370 (Hernández Ávila et al., 2021), ambos linajes con una alta prevalencia en EUA.

## Conclusiones

Podemos asegurar que las mutaciones encontradas en El Salvador coinciden con mutaciones que ya habían sido reportadas a nivel mundial y por tanto no se pudo determinar si algunas se originaron de manera autóctona. Las secuencias presentan mayor semejanza con los cambios descritos en Norteamérica, sumado a ello, el análisis global permitió clasificarlas en el clado GISAID GH, y linaje pangolín B.1.2 y B.1.370, ambos linajes con una alta prevalencia en EUA, lo cual refuerza la hipótesis del origen norteamericano de las secuencias salvadoreñas. El patrón de cambios del genoma de SARS-CoV-2 en El Salvador, sugiere que las mutaciones se deben a la acción de las desaminasas APOBEC (transición C>T) y ADARs (transición A>G), al efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS) (transversión G>T), a errores propios del complejo replicación transcripción (RTC) que

escapan a la corrección de la actividad exonucleasa de NSP14 y finalmente mutaciones como resultado de mecanismos de recombinación. Respecto a los eventos de recombinación que conducen a la adquisición de los residuos de unión a ACE2 que se encuentran en algunos linajes de SARS-CoV-2 que circulan a nivel mundial y en nuestro país, en donde la escisión similar a la furina en la unión S1 / S2 también se encuentra dentro de uno de los posibles fragmentos afectados, será necesario más estudio y análisis del fenómeno de recombinación en SARS-CoV2 de secuencias de El Salvador que se dará en una próxima entrega.

Es necesario continuar secuenciando más genomas de SARS-CoV-2 aislados de pacientes de El Salvador, con el objetivo de verificar si se detectan patrones de mutaciones típicos de otras regiones geográficas; tales como las variantes inglesa, sudafricana, brasileña y de California; además, vigilar el apareamiento de mutaciones no reportadas en otros países y analizar sus posibles efectos sobre la infectividad y transmisibilidad, la eficacia farmacológica (antivirales y vacunas) y el efecto en las regiones utilizadas para la detección y diagnóstico.

Los autores certifican que no existe ningún conflicto de interés que afecte el presente trabajo. Todos los experimentos se realizaron con equipos y reactivos de la Universidad de El Salvador en el marco del proyecto de secuenciación de SARS-CoV2 en El Salvador y el proyecto 15-04 que se realizan actualmente en la Sección de Virología y Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.

Todos los experimentos para obtener las secuencias de SARS-CoV2 se realizaron en las instalaciones de la Sección de Virología y Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por contribuir a generar las condiciones en Laboratorio de Virología para la realización de este trabajo. A las autoridades de la Universidad de El Salvador y de la Facultad de Medicina por el apoyo logís-

tico y demás recursos de laboratorio necesarios para la realización de la presente investigación. Al Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador (CIC-UES) en particular por el apoyo decidido a la investigación científica en El Salvador.

## Referencias bibliográficas

Alouane, T., Laamarti, M., Essabbar, A., Hakmi, M., Bendaïni, H., Laamarti, R., Ghrifi, F., Allam, L., Aanniz, T., Mentag, R., Sbabou, L., Nejari, C., Amzazi, S., & Belyamani, L. (2020). SARS-CoV-2 Genomes: Moving Toward a Universal Vaccine for the “Confined Virus”? 1–19.

Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W., & Buchmeier, M. J. (2013). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *MBio*, 4(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13>

Becares, M., Pascual-iglesias, A., Nogales, A., Sola, I., Enjuanes, L., & Zuñiga, S. (2016). Mutagenesis of Coronavirus nsp14 Reveals Its Potential Role in. *Journal of Virology*, 90(11), 5399–5414. <https://doi.org/10.1128/JVI.03259-15>. Editor

Brufsky, A. (2020). Distinct viral clades of SARS- CoV-2: Implications for modeling of viral spread. *Journal of Medical Virology*, 92(9), 1386–1390. <https://doi.org/10.1002/jmv.25902>

Case, J. B., Ashbrook, A. W., Dermody, T. S., & Denison, M. R. (2016). Mutagenesis of S -Adenosyl-l-Methionine-Binding Residues in Coronavirus nsp14 N7- Methyltransferase Demonstrates Differing Requirements for Genome Translation and Resistance to Innate Immunity . *Journal of Virology*, 90(16), 7248–7256. <https://doi.org/10.1128/jvi.00542-16>

Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., & Guo, D. (2009). Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural

protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3484–3489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808790106>

Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

Di Giorgio, S., Martignano, F., Torcia, M. G., Mattiuz, G., & Conticello, S. G. (2020). Evidence for host-dependent RNA editing in the transcriptome of SARS- CoV-2. *BioRxiv*, June, 1–8. <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.973255>

Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2018). A-to-I RNA editing—immune protector and transcriptome diversifier. *Nature Reviews Genetics*, 19(8), 473–490. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0006-1>

Ferron, F., Subissi, L., De Morais, A. T. S., Le, N. T. T., Sevajol, M., Gluais, L., Decroly, E., Vonnrhein, C., Bricogne, G., Canard, B., & Imbert, I. (2017). Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), E162–E171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718806115>

Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., & Snijder, E. J. (2006). Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome.

Virus Research, 117(1), 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.virus-res.2006.01.017>

Gribble, J., Stevens, L. J., Agostini, M. L., Anderson-Daniels, J., Chappell, J. D., Lu, X., Pruijssers, A. J., Routh, A. L., & Denison, M. R. (2021). The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. *PLoS Pathogens*, 17(1), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009226>

Harris, R. S., & Dudley, J. P. (2015). APOBECs and virus restriction. *Virology*, 479–480, 131–145. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.012>

Hernández Ávila, C. E., Ortega Pérez, C. A., Rivera, N. R., & López, X. S. (2021). Primeras seis secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 por NGS en El Salvador. *Alerta, Revista Científica Del Instituto Nacional de Salud*, 4(1), 61–66. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10682>

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

Kuljić-Kapulica, N., & Budisin, A. (1992). Coronaviruses. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 120(7–8), 215–218. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15013>

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

Mercatelli, D., & Giorgi, F. M. (2020). Geographic and Genomic Distribution of SARS- CoV-2 Mutations. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01800>

Niodel, M., Appourchaux, R., Nguyen, X. N., Delpeuch, M., & Cimarelli, A. (2019). The DNA damage induced by the Cytosine Deaminase APOBEC3A Leads to the production of ROS. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40941-8>

Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), 439–450. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>

Phuphuakrat, A., Kraiwong, R., Boonarkart, C., Lauhakirti, D., Lee, T.-H., & Auewarakul, P. (2008). Double-Stranded RNA Adenosine Deaminases Enhance Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteins. *Journal of Virology*, 82(21), 10864–10872. <https://doi.org/10.1128/jvi.00238-08>

Pollpeter, D., Parsons, M., Sobala, A. E., Coxhead, S., Lang, R. D., Bruns, A. M., Papaioannou, S., McDonnell, J. M., Apolonia, L., Chowdhury, J. A., Horvath, C. M., & Malim, M. H. (2018). Deep sequencing of HIV-1 reverse transcripts reveals the multifaceted antiviral functions of APOBEC3G. *Nature Microbiology*, 3(2), 220–233. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0063-9>

Saberi, A., Gulyaeva, A. A., Brubacher, J. L., Newmark, P. A., & Gorbalenya, A. E. (2018). A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007314>

Salter, J. D., & Smith, H. C. (2018). the Embrace of a Mutator: APOBEC Selection of Nucleic Acid Ligands. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(8), 606–622. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.04.013>



Smith, E. C., & Denison, M. R. (2012). Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses. *Current Opinion in Virology*, 2(5), 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.005>

Snijder, E. J., Limpens, R. W. A. L., de Wilde, A. H., de Jong, A. W. M., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Maier, H. J., Faas, F. F. G. A., Koster, A. J., & Bárcena, M. (2020). A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biology*, 18(6), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000715>

Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., & Enjuanes, L. (2015). Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annual Review of Virology*, 2, 265–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055218>

Sola, I., Mateos-Gomez, P. A., Almazan, F., Zúñiga, S., & Enjuanes, L. (2011). RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biology*, 8(2), 237–248. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14991>

Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., & Canard, B. (2014). SARS- CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: Replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Research*, 101(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.006>

Tagliamonte, M. S., Abid, N., Borocci, S., Sangiovanni, E., Ostrov, D. A., Kosakovsky Pond, S. L., Salemi, M., Chillemi, G., & Mavian, C. (2021). Multiple recombination events and strong purifying selection at the origin of SARS-CoV-2 spike glycoprotein increased correlated dynamic movements. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22010080>

Taylor, D. R., Puig, M., Darnell, M. E. R., Mihalik, K., & Feinstone, S. M. (2005). New Antiviral Pathway That Mediates Hepatitis C Virus Replicon Interferon Sensitivity through ADAR1. *Journal of Virology*, 79(10), 6291–6298. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.10.6291-6298.2005>

Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., Zheng, M., Chen, L., & Li, H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5), 766–788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>

Zahn, R. C., Schelp, I., Utermöhlen, O., & von Laer, D. (2007). A-to-G Hypermutation in the Genome of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of Virology*, 81(2), 457–464. <https://doi.org/10.1128/jvi.00067-06>

Zhao, S., & Chen, H. (2020). Modeling the epidemic dynamics and control of COVID-19 outbreak in China. *MedRxiv*, 1–9. <https://doi.org/10.1101/2020.02.27.20028639>

Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>

# Capítulo 8. Biotecnología microbiana



# Thermostability enhancement of the *Pseudomonas fluorescens* esterase I by in vivo folding selection in *Thermus thermophilus*

Diana M. Mate<sup>1</sup>

Noé R. Rivera<sup>1,2</sup>

Esther Sanchez-Freire<sup>1</sup>

Juan A. Ayala<sup>3</sup>

José Berenguer<sup>1</sup> **Orcid:** <http://orcid.org/0000-0002-9689-6272>

Aurelio Hidalgo<sup>1</sup> **Orcid:** <http://orcid.org/0000-0001-5740-5584>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Center of Molecular Biology “Severo Ochoa” (UAM- CSIC), Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of El Salvador, San Salvador, El Salvador

<sup>3</sup>Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Center of Molecular Biology “Severo Ochoa” (UAM-CSIC), Madrid, Spain

**Correspondence:** Aurelio Hidalgo, Department of Molecular Biology, Center of Molecular Biology “Severo Ochoa” (UAM-CSIC), Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain. Email: [ahidalgo@cbm.csic.es](mailto:ahidalgo@cbm.csic.es)

**How to cite this article:** Mate DM, Rivera NR, Sanchez-Freire E, Ayala JA, Berenguer J and Hidalgo A. Thermostability enhancement of the *Pseudomonas fluorescens* esterase I by in vivo folding selection in *Thermus thermophilus*. Biotechnology and Bioengineering. 2020; 117:30–38. <https://doi.org/10.1002/bit.27170>

## Abstract

Prolonged stability is a desired property for the biotechnological application of enzymes since it allows its reutilization, contributing to making biocatalytic processes more economically competitive with respect to chemical synthesis. In this study, we have applied selection by folding interference at high temperature in *Thermus thermophilus* to obtain thermostable variants of the esterase I from *Pseudomonas fluorescens* (PFEI). The most thermostable variant (Q11L/A191S) showed a melting temperature ( $T_m$ ) of  $77.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$  ( $4.6^\circ\text{C}$  higher than the wild-type) and a half-life of over 13 hr at  $65^\circ\text{C}$  (7.9-fold better than the wild-type), with unchanged kinetic parameters. Stabilizing mutations Q11L and A191S were incorporated into PFEI variant L30P, previously described to be enantioselective in the hydrolysis of the (-) -enantiomer of the Vince lactam. The final variant Q11L/L30P/A191S showed a significant improvement in thermal stability ( $T_m$  of  $80.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$  and a half-life of 65 min at  $75^\circ\text{C}$ ), while retaining enantioselectivity ( $E > 100$ ). Structural studies revealed that A191S establishes a hydrogen bond network between a V-shaped hairpin and the  $\alpha/\beta$  hydrolase domain that leads to higher rigidity and thus would contribute to explaining the increase in stability.

**Keywords:** directed evolution, esterase, in vivo selection, protein engineering, thermostability, *Thermus thermophilus*

## 1. Introduction

Thermal stability is an attractive property of enzymes for biocatalysis because it allows long-term storage and (re)use under harsh conditions (e.g., presence of organic solvents or detergents; Haki & Rakshit, 2003). In addition, the use of thermostable enzymes in processes at higher temperatures favors the solubility of substrates and products and makes the processes less susceptible to microbial contamination (Bommarius & Paye, 2013).

Comprehensive explorations of the natural genetic diversity, that is, metagenomic screening, are an easy and efficient way to find thermostable enzymes with a given target activity. However, the low diversification of thermophiles and their small genomes entail a limited enzymatic diversity compared to that found in mesophilic environments. Moreover, industrial reactions often require mechanisms, substrate specificit and selectivities that might not be found in nature. To overcome this limitation, directed evolution can generate thermostable variants of enzymes from mesophilic sources. Therefore, more efficient, simple and inexpensive methods are required that can be used to screen for enzymes with increased performance at high temperatures. An interesting option is the development of indirect functional selection methods in which the target property is linked to the viability of the host microorganism (e.g., by using an antibiotic reporter). There are also methods based on the connection of the target feature with the proper folding of a reporter protein. Waldo, Standish, Berendzen, and Terwilliger (1999) reported an elegant assay to increase protein solubility in which the target protein is expressed as an N-terminal fusion with a green fluorescent protein (GFP). Fisher, Kim, and DeLisa (2006) described a selection method in which a twin-arginine translocation (Tat)-based solubility reporter is used to selecting correctly folded proteins. However, these selection approaches are based on the use of a mesophilic host. Our group previously described an activity- independent selection system based on a fusion construct comprising a target protein (N-terminus) and a thermostable antibiotic resistance reporter (C-terminus) expressed in a thermophile host (Chautard et al., 2007). In this method, thermostable variants of the protein of interest would fold correctly at a high temperature allowing, in turn, the proper folding of the reporter and the growth on antibiotic-containing plates, whereas the wild-type enzyme will misfold and interfere in the folding of the reporter, yielding sensitive hosts.

The esterase I from the Gram-negative bacterium *Pseudomonas fluorescens* (PFEI; E.C. 3.1.1.2) is a monomeric enzyme of 31 kDa that can be overexpressed in *Escherichia coli* (Choi, Jeohn, Rhee, &

Yoo, 1990). Site-directed mutagenesis studies have been previously carried out on PFEI aiming to increase its activity in the hydrolysis of epoxides (Jochens et al., 2009) and lactones (Ding & Kazlauskas, 2017; D. L. Yin et al., 2010), in the perhydrolysis of carboxylic acids (D. T. Yin, Purpero, Fujii, Jing, & Kazlauskas, 2013), and to improve the enantioselectivity in the kinetic resolution of diverse chiral substrates (Schließmann, Hidalgo, Berenguer, & Bornscheuer, 2009; Torres et al., 2012). In addition, simultaneous site-saturation mutagenesis was performed on three surface positions of PFEI to enhance its thermal stability (Jochens, Aerts, & Bornscheuer, 2010).

In this study, thermal stabilization of PFEI was carried out *in vivo* in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* by folding interference (Chautard et al., 2007). Here, we describe how this method allowed us to find stabilizing amino acid replacements in the PFEI scaffold. In addition, the new replacements were able to overstabilize a previously reported variant that showed (–)-selectivity in the ring-opening of the Vince lactam (Torres et al., 2012), a key building block in the synthesis of nucleoside analogs used against human immunodeficiency virus (Coates et al., 1991). This final variant displayed very high stability against temperature and organic solvents, as well as the enantio-selective  $\gamma$ - (–)-lactamase activity, making it a very promising biocatalyst in the synthesis of antiviral drugs.

## 2. Experimental procedures

### 2.1 Reagents and enzymes

The pNCK E. coli–*T. thermophilus* shuttle plasmid was constructed by Chautard et al. (2007). The pGASTON-pfei expression plasmid was kindly donated by Prof Uwe Bornscheuer from Greifswald University (Germany). L-rhamnose, D-(+) glucose, SYPRO Orange Protein Gel Stain, para-nitrophenyl acetate (pNPA), N, N-dimethylformamide (DMF), 2- Azabicyclo [2.2.1] hept-5-en-3-one, (1R)-(–)-2-Azabicyclo [2.2.1] hept-5-en-3-one, (1S)-(+)-2-Azabicyclo



[2.2.1] hept-5-en-3-one, and all primers (Table S4) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ethanol was from VWR Chemicals (Radnor, PA). Fast Red, 1-naphthyl acetate, sodium chloride, and glycerol Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland).

Dimethyl sulfoxide (DMSO) was from Panreac AppliChem, acetonitrile was from Scharlau and trifluoroacetic acid was from Pierce. Lysozyme was from Roche (Basel, Switzerland). Benzonase nuclease and BugBuster were purchased from Novagen (Madison, WI). PfuUltra II Fusion Hot Start DNA polymerase was from Agilent Technologies (Santa Clara, CA). NZYTaq DNA polymerase was from NZYTech (Lisboa, Portugal). Bacteriological agar, tryptone, and yeast extract were from Laboratorios Conda (Madrid, Spain). Sodium chloride and imidazole were from Merck (Merck Millipore). *E. coli* DH5, *T. thermophilus* HB27 and DNA ladder (range from 72 to 4,370 base pair [bp]) were provided by the fermentation service from the Center of Molecular Biology “Severo Ochoa” (Madrid, Spain). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) molecular weight standards (low range) were from Bio-Rad (Hercules, CA). The NucleoSpin Gel and polymerase chain reaction (PCR) clean-up kit was from Macherey-Nagel (Düren, Germany). The GeneJET plasmid Miniprep kit and all high-fidelity restriction enzymes were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

## 2.2 Cloning of PFEI into pGASTON vector

The parental *pfeI* gene and the 36 selected mutants were cloned into pGASTON for expression in *E. coli* DH5 $\alpha$  as His-tagged products (C-terminal) under the control of the *rhaP*BAD promoter. A primer pair containing *NdeI* and *BamHI* sites were designed to sub-clone *pfeI* into pGASTON (Table S4).

## 2.3 Library construction and selection of thermostable variants

A library of the gene encoding the PFEI was obtained by epPCR using the *E. coli*-*T. thermophilus* shuttle vector pNCK as a template.

The pfeI gene was cloned using BamHI and NotI. Reaction mixture was prepared in 50 µl containing: 0.05 ng/µl DNA template, 0.5 µM direct primer, 0.5 µM reverse primer, 0.2 mM dATP and dGTP, 0.1 mM dCTP and dTTP, 0.05–0.25 mM MnCl<sub>2</sub>, and 0.05 U/µl NZYTaq DNA polymerase. Mutagenic PCR was carried out on a thermal cycler (C1000 Touch; BioRad) using the program: 95°C, 2 min (1 cycle); 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 74°C for 70 s (30 cycles); 74°C for 10 min (1 cycle). Primers pNCKepfw3 and pNCKeprv2 were used for sequencing (Table S4).

*T. thermophilus* HB27 was transformed by natural competence by adding 150 ng of plasmid DNA to 0.5 ml of cell culture at exponential phase (OD<sub>600</sub> 0.3–0.4) in *Thermus* broth medium (TB; 8 g/L tryptone, 4 g/L yeast extract, and 3 g/L NaCl in carbonate-rich mineral water). Cultures were incubated 4 hr after the addition of DNA and the suspension was directly spread on selection plates with antibiotic or diluted before plating for viability assays. Chemically competent *E. coli* DH5α cells were transformed using 45 µL of competent cells and 100–200 ng of plasmid DNA or 5 µl of ligation product.

## 2.4 Site-directed mutagenesis

Single mutants Q11L, L30P, and A191S were generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Genomics), following the manufacturer's protocol. The incorporation of these mutations was done on the plasmid pGASTON-pfeI using the corresponding primers (Table S4).

## 2.5 Protein expression

*T. thermophilus* HB27EC (ago::ISTth7; Swarts et al., 2014) was grown in *Thermus* broth (TB; 8 g/L tryptone, 4 g/L yeast extract, and 3 g/L NaCl in carbonate-rich mineral water). *E. coli* DH5α (supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) was used both for plasmid amplification and PFEI expression.

Expression of PFEI variants was carried out in 96-well plate format. Colonies of DH5 $\alpha$  harboring pGASTON-pfeI and the 36 variants were picked from Luria-Bertani lysogeny broth (LB) agar plates containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin into 96 deep-well microtiter plates containing 500  $\mu$ l/well of LB media with 100  $\mu$ g/ml ampicillin. After cultivation for 24 hr at 30°C and 180 rpm, 100  $\mu$ l of preculture was inoculated in another 96 deep-well plates with 1.8 ml autoinduction medium and incubated for 24 hr at 30°C and 180 rpm (Ecotron, Infors HT, Bottmingen, Switzerland). Cultures were harvested by centrifugation at 3,220g, 4°C for 30 min (Eppendorf centrifuge 5804 R; Eppendorf, Germany) and cell pellets were stored at -20°C.

For biocatalysis assays, PFEI variants were produced in the flask. Precultures (10 ml LB medium, 100  $\mu$ g/ml ampicillin) were inoculated with single colonies from LB/ampicillin plates and incubated for 16 hr at 37°C and 180 rpm. Then, 1.5 ml of preculture were inoculated in 98.5 ml autoinduction medium (916 ml ZY solution—10 g/L tryptone and 5 g/L yeast extract; 10 ml 20% L-rhamnose; 2.5 ml 20% glucose; 20 ml 25 g/L glycerol; 50 ml phosphate buffer 20X—66 g/L ammonium sulfate 136 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ml, and 142 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>; and 500  $\mu$ L 200 mg/ml ampicillin) in 500-ml flasks and cultivated at 30°C and 180 rpm for 24 hr. Cultures were harvested by centrifugation at 3,220g, 4°C for 30 min (Eppendorf centrifuge 5804 R) and cell pellets were stored at -20°C.

## 2.6 Protein purification

### 2.6.1 Purification in 96-well plate format

Cell pellets were resuspended in 300  $\mu$ l/well of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5 containing BugBuster (1X in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5). After incubation at 30°C and 180 rpm for 1 hr, plates were centrifuged at 3,220g and 4°C for 30 min (Eppendorf centrifuge 5804 R). Cell lysates were added into 96-well plates containing nickel sepharose resin (HisMultiTrap FF; GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA) and PFEI variants were pu-

rified following the manufacturer's protocol. The purity of wild-type PFEI and its variants was determined by 12% SDS-PAGE. The purified enzymes were dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 and concentrated using Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter units with 3 kDa cut-off (Merck Millipore Ltd., Burlington, MA) in a refrigerated microcentrifuge (Mikro 220 R, Hettich, Kirchleugern, Germany). Protein concentration was measured with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

### **2.6.2 Purification in column**

Cell pellets (~1.5 g) were resuspended in 30 ml binding buffer (50 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, and 20 mM imidazole, pH 7.5) and 2 µl benzonase nuclease were added. Cell disruption was carried out with a pressure homogenizer (GEA Niro homogenizer, Düsseldorf, Germany) and the lysate was centrifuged at 14,000g and 4°C for 30 min (Avanti J-25 centrifuge; Beckman Coulter). Nickel resin of 1.6 ml (Ni-NTA Superflow; QIAGEN, Hilden, Germany) were washed with 20 ml Milli-Q water and equilibrated with 20 ml binding buffer. Manufacturer's manual was followed for enzyme purification (elution buffer: 50 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, and 20 mM imidazole, pH 7.5). Homogeneity of purified enzymes was assessed by SDS-PAGE. Then, purified samples were dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 and concentrated Amicon ultra-15 centrifugal filter units with 3 kDa cut-off (Merck Millipore Ltd.) in a refrigerated centrifuge (Eppendorf 5804 R, Eppendorf). Protein concentration was measured with the Bio-Rad protein assay.

## **2.7 Biochemical characterization**

### **2.7.1 Activity assay in the agar plate**

The assay of esterase activity in plates with solid medium LB/ampicillin 100 µg/ml was used to identify *E. coli* clones that contain active esterase variants previously selected in *T. thermophilus* HB27EC. Two replicates of each clone were made with their respective controls, positive (pNCK- pfeI) and negative (pNCK), and incubated at 37°C for 16 hr. Then, one of the plates was covered with

0.5% agar solution containing 1.42 mg/ml Fast Red and 0.32 mg/ml  $\alpha$ -naphthyl acetate.

### **2.7.2 Activity assay in the microtiter plate**

Esterase activity was determined at room temperature in 96-well plate using 20  $\mu$ l of suitable enzyme dilutions, 210  $\mu$ l of Tris-HCl buffer (pH 7.5), and 20  $\mu$ L of 62.5 mM pNPA in 8% (vol/vol) DMSO. The release of para-nitrophenolate (pNP) was detected at 410 nm ( $\epsilon$ pNP = 13.3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at pH 7.5) over time in a microplate reader (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany).

### **2.7.3 Kinetic parameters**

Steady-state enzyme kinetics of PFEI variants were determined at room temperature with 0–12.5 mM pNPA and 10% (vol/vol) DMSO. Initial rates (s<sup>-1</sup>) were plotted against substrate concentration (mM) and adjusted to the Michaelis–Menten model using a simple rectangular hyperbola of two parameters with function  $f(x) = a \times x / (b + x)$ , being  $a$  the  $k_{cat}$  and  $b$  the  $K_M$ .

### **2.7.4 Stability assays**

Thermodynamic stability of wild-type PFEI and its variants was assessed by differential scanning fluorimetry (Lavinder, Hari, Sullivan, & Magliery, 2009). A 20  $\mu$ M solution of enzyme in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) was supplemented with SYPRO Orange (Sigma-Aldrich) and subjected to a temperature ramp from 35°C to 95°C at 1°C/min in a real-time thermocycler (Rotor Gene<sup>TM</sup> 6000; Corbett Life Science, Sydney, Australia). Increase in fluorescence was quantified in the HRM channel ( $\lambda_{ex}$ : 460  $\pm$  20 nm;  $\lambda_{em}$ : 510  $\pm$  5 nm). The measurement was carried out in triplicate.

Kinetic stability of PFEI variants was determined by incubating solutions of each purified enzyme (appropriate dilution to produce a linear response) and determining the remaining activity over time using the pNPA assay described above. The enzymes were incubated in a heating block (ThermoMixer; Eppendorf, Hamburg, Germany)

at 65°C and 75°C in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5. The half-life was determined from this plot as the time in which the activity is 50% of the initial activity.

The tolerance to organic solvents of wild-type PFEI and its variants was evaluated by incubating solutions of each purified enzyme (appropriate dilution to produce a linear response) and determining the remaining activity using pNPA. The enzymes were incubated in a heating block at 42°C and in the presence of 40% (vol/ vol) ethanol or DMF in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The half-life was determined from this plot as the time in which the activity is 50% of the initial activity.

#### ***2.7.5 Determination of enantioselectivity by high-performance liquid chromatography***

Enzymatic reactions were set up in 2 ml containing 4 mM of racemic Vince lactam and 10 µg of the pure enzyme in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5. The reactions were incubated at 37°C and 500 rpm, samples were taken at different times and subjected to enzyme inactivation at 80°C for 15 min. Samples were filtered through 0.22 µm (Millex-GV; Merck Millipore Ltd,) before loading into the column.

The stereoisomers of the Vince lactam were separated on a Lux Cellulose-1 column (250 × 4.6 mm ID, cellulose tris (3,5-dimethyl-phenyl)carbamate) coated on 5 µm silica-gel; Phenomenex, CA) using a HPLC system (Waters 1525 binary HPLC pump and Waters 2489 UV/visible detector; Waters Corporation, MA). The mobile phase consisted of 95% ultrapure water containing 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid, the temperature was set at 30°C, the flow rate was 0.4 ml/min and the UV signal was monitored at 225 nm. The retention times for the (1R) - and (1S) -Vince Lactam enantiomers were 10.8 and 13.0 min, respectively. Coefficient of variance between repeated experiments was below 10%. Enantioselectivity was calculated as the E value using the Chen equation with the conversion and the enantiomeric excess of the recovered substrate fraction (ees) as input data (Chen, Fujimoto, Girdaukas, & Sih, 1982).

## 2.8 Structural modeling

Homology models of the PFEI variants were created using YASARA (YASARA Biosciences GmbH, Vienna, Austria) using the default automated macro (Krieger & Vriend, 2014). Homology modeling was carried out with the template with PDB code 1VA4. Loops were modeled using a maximum of 50 conformations per loop. Quality of homology models was verified by calculating the individual Z scores with the formula  $\text{Overall} = 0.145 \times \text{Dihedrals} + 0.390 \times \text{Packing1D} + 0.465 \times \text{Packing3D}$ . The overall score thus captures the correctness of backbone (Ramachandran plot) and side-chain dihedrals, as well as packing interactions. Images were generated with PyMOL v0.99 (Schrödinger, LLC).

## 2.9 Bioinformatic analysis of gene sequences

The assembly, alignment, and translation of gene sequences were carried out using the SnapGene software version 4.2.6 (GSL Biotech).

## 2.10 Bioinformatic analysis of enzyme stability

Calculations of  $\Delta G$  for PFEI wild-type and its variants were performed using the YASARA software with the FoldX plugin (Schymkowitz et al., 2005).

# 3. Results and discussion

## 3.1 PFEI library generation and selection of thermostable variants

The incorporation of mutations into the gene encoding the PFEI was carried out by error-prone PCR (epPCR). Four  $\text{MnCl}_2$  concentrations ranging from 0.05 to 0.15 mM were tested to evaluate the mutagenic frequencies on the *pfeI* gene (843 bp; Figure S1). Gene sequences of randomly picked clones were analyzed, leading to nucleotide substitution frequencies from 0.7 to 1.9 per gene. We used



0.15 mM MnCl<sub>2</sub>, to introduce between 1 and 5 nucleotide substitutions (1–3 amino acid substitutions) in the *pfeI* gene, which is a mutational load suitable for directed evolution studies (Mate et al., 2016).

The selection of thermostable variants of PFEI was carried out using the folding interference principle at high temperature in *T. thermophilus* HB27EC, a hypertransformable mutant of *T. thermophilus* (Swarts et al., 2014). To this end, the *pfeI* gene was cloned in fusion with the kanamycin nucleotidyltransferase (*kat*) gene into the pNCK vector (Chautard et al., 2007). The selection conditions in *T. thermophilus* HB27EC were fixed at the minimum temperature and kanamycin concentrations at which transformants expressing the wild-type PFEI-Kat fusion could not grow. The temperatures tested were 60°C and 65°C and the kanamycin concentrations assayed were 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml and the chosen selection conditions were 65°C and 60 and 80 µg/ml kanamycin (Table S1).

A library of 90,000 PFEI variants was explored under the selected conditions. Considering that PFEI has 274 amino acids and that the number of sequences containing *N* amino acid substitutions is given by the formula  $19N \cdot (274! / (274-N)! \cdot N!)$  (Arnold, 1996), our library is expected to contain all possible single substitution variants and only 0.7% of the double substitution variants. However, these numbers are calculated for an ideal scenario and not for an enzyme library generated by epPCR, since this method is limited by the bias of DNA polymerases and not all possible substitutions can occur (Wong, Zhurina, & Schwaneberg, 2006). As a result of the selection, 234 clones were obtained at 65°C, 157 on plates with 60 µg/ml of kanamycin and 77 on plates with 80 µg/ml (Table 1). Due to the fact that *T. thermophilus* HB27EC possesses intrinsic esterase activity precluding a direct, on-plate functional assay, the plasmids had to be extracted from *Thermus* and transformed in *E. coli* for esterase activity at 37°C. The 55 fusion variants showing activity in *E. coli* were transferred back to *T. thermophilus* HB27EC to verify their capability to confer antibiotic resistance at 65°C using a serial dilution assay. The conferred resistance values were assigned from



+1 if only the undiluted culture grew to +4 if growth was detected at a 1/ 1,000 dilution. The 36 best variants in this assay were sequenced revealing different amino acid replacements, including mutational hot- spots (i.e., positions where different amino acids replacements took place) at positions 3, 26, 168, and 192 (Figure 1; Table S2). Specifically, Thr3 was mutated to alanine, isoleucine, and serine, Ser26 to cysteine and isoleucine, Lys168 to arginine and methionine, and Thr192 to alanine and serine (Table S2).

### 3.2 PFEI expression and purification in the microtiter plate

To characterize the wild-type PFEI and the 36 selected mutants at once, we set up an expression and purification protocol in microtiter plate format. The collection of variants was expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$  from plasmid pGaston in 96-well deep-well plate using autoinduction medium (Studier, 2005) modified with 0.05% glucose and 0.2% rhamnose. Cell lysis was carried out using BugBuster and the 6X His-tagged wild-type protein was purified in a 96-well plate containing nickel resin. As observed in Figure S2, purification yields were very similar across all the wells and enough for further studies.

### 3.3 Biochemical characterization of PFEI variants

Thermal stability was evaluated as thermodynamic stability (melting temperature;  $T_m$ ) and kinetic stability (half-life; Bommarius & Paye, 2013). Unexpectedly,  $T_m$  values of selected mutants spanned 32°C (Figure 2a; Table S3), between 44.7°C (variant 31) and 77.3°C (variant 34; Q11L/A191S). Actually, only two variants showed increased  $T_m$  values respect to the wild-type: Variants 34 and 49 (S157C), with  $T_m$  values 4.6°C and 2.2°C higher than the wild-type, respectively. These two variants represent only 5.6% of all selected individuals. We hypothesize that this unexpected result is due to the fact that the selection was carried out with the fusion protein PFEI-Kat in vivo in *T. thermophilus*, while the  $T_m$  values were determined in vitro for the individual, purified PFEI variants. Fusions of proteins to another partner can alter properties such as

stability, selectivity, or activity. For instance, fusions to superfolder GFP or maltose-binding domains have been shown to positively influence solubility or prosequences of lipases, for example, *Rhizopus oryzae*, influence stability as well as substrate specificity (Beer, Wohlfahrt, Schmid, & McCarthy, 1996; Takahashi, Ueda, & Tanaka, 1999). Nevertheless,  $T_m$  values were in good agreement with the corresponding kinetic stability. Variant 34 showed a half-life of 13.1 hr at 65°C (7.9-fold longer than the wild-type), and variant 49 showed a half-life of 4.6 hr at 65°C (2.8-fold longer than the wild-type; Figure 2b; Table S3).

**Table 1.** Number of *T. thermophilus* HB27<sup>EC</sup> transformants containing pNCK-pfeI wild-type or the PFEI gene library after selection at 65°C and 60 and 80 µg/ml kanamycin

Kanamycin (µg/ml)		
Construct	60	80
pNCK-pfeI wild-type	0	0
pNCK-pfeI gene library	157	77

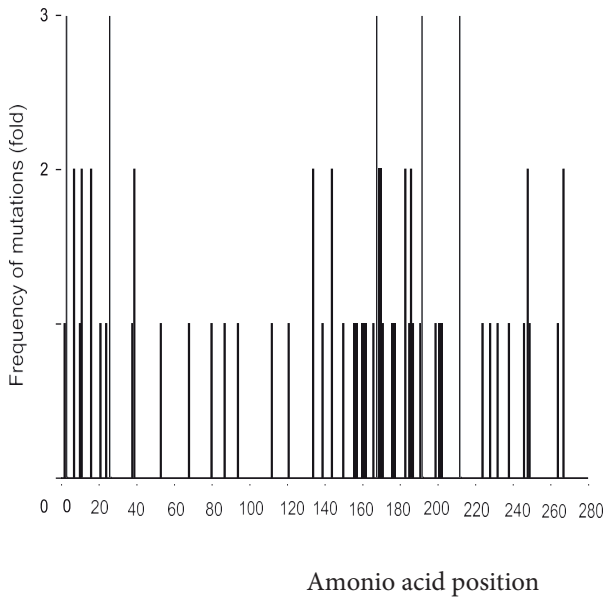
The effect of the substitutions Q11L and A191S from variant 34 on stability was studied independently. A191S had a more pronounced effect on the enhancement of thermostability than Q11L (Table S3). In addition, the triple variant E82N/K87L/E88D was incorporated into the study. This variant was previously obtained by site-saturation mutagenesis on three surface positions identified by B-fitter (Jochens et al., 2010), resulting in a  $T_m$  9°C higher than the wild-type (6°C according to our results; Table S3). Variant 34 (Q11L/A191S) showed an increased kinetic thermostability compared with variant E82N/K87L/E88D, reflected in 6.5 hr longer half-life at 65°C. According to these results, the epPCR approach led to higher stabilization of the PFEI than structure-based studies, in good agreement the fact that location-agnostic approaches (e.g., epPCR) afford more stabilization for  $\alpha/\beta$  hydrolases than structure-based methods (Jones, Lim, Huang, & Kazlauskas, 2017).

Steady-state kinetic constants of the wild-type and the 36 variants were determined with para-nitrophenyl acetate (pNPA; Figure 2b; Table S3). These values drift neutrally, as expected, since they were not involved in the selection criteria used. The most thermostable variant, PFEI 34, showed very similar  $K_M$  and  $k_{cat}$  values to those of the wild-type enzyme. In addition, we characterized the previously reported variant E82N/K87L/E88D resulting in a 2.1-fold lower  $K_M$  and a 1.7-fold increased  $k_{cat}$  compared with the wild-type (Table S3). Interestingly, variant 14 showed the mutation K87M, which increased  $k_{cat}$  by 1.7-fold, very similar to that of the variant E82N/K87L/E88D (Table S3).

### 3.4 Lactamase activity of thermostable variants

The next step was to investigate whether substitutions Q11L and A191S gave rise to a stabilizing effect when incorporated into a biocatalytically relevant PFEI variant, namely L30P (L29P according to the numbering of amino acids in the crystal structure). This particular esterase shows enantioselective lactamase activity towards the (–) - enantiomer of the Vince lactam (2-azabicyclo [2.2.1] hept-5-en-3-one), the synthetic precursor in the synthesis of carbovir and abacavir, two DNA polymerase inhibitors used in the treatment of human immuno- deficiency virus and hepatitis B virus (Torres et al., 2012; Figure S3).

**Figure 1.** Frequency of mutations in the 36 PFEI variants selected at 65°C

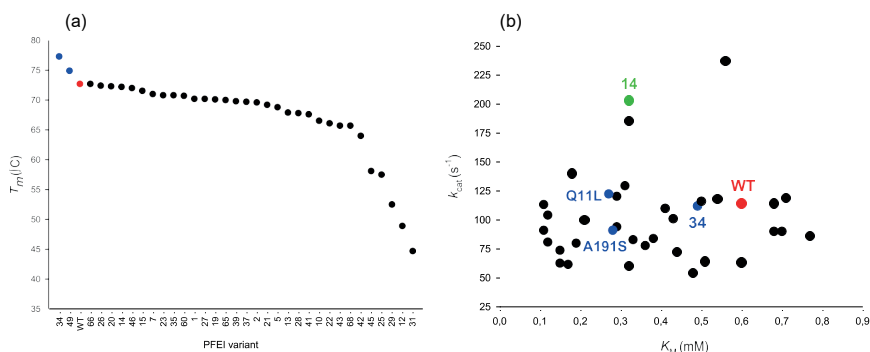


First, the single variant L30P, the double mutants Q11L/L30P and L30P/A191S, and the triple variant Q11L/L30P/A191S were cloned into the expression plasmid pGASTON, subsequently produced in *E. coli* and purified to homogeneity. The enantioselectivity of the promiscuous hydrolysis reaction of the Vince lactam was verified. As shown in Table 2, wild-type PFEI, the double mutant Q11L/A191S, the single variant L30P, and the triple mutant Q11L/L30P/A191S were still enantioselective with a preference towards the (–) enantiomer. Furthermore, variants containing the substitution L30P showed a much higher conversion rate of the (–) -enantiomer than the wild-type and the double mutant Q11L/A191S, as previously reported (Torres et al., 2012).

Regarding thermal stability, L30P led to a significant additional stabilizing effect, resulting in a 4.3°C increase in  $T_m$  over the wild-type and a threefold increase in half-life at 75°C, very similar to the stability of variant 34 (Q11L/A191S; Table 2). Amino acid replacements to proline have been reported to enhance stability (Huang,

Jones, & Kazlauskas, 2015; Watanabe, Masuda, Ohashi, Mihara, & Suzuki, 1994). In fact, proline limits the flexibility of the unfolded protein compared with other amino acids, causing a decrease in the configurational entropy of unfolding and shifting the equilibrium towards the folded form (Matthews, Nicholson, & Becktel, 1987).

**Figure 2.** Biochemical characterization wild-type PFEI and its variants. (A)  $T_m$  values of wild-type PFEI and its variants. Measurements were done in triplicate.  $T_m$  of wild-type is colored in red and  $T_m$  of variants 34 (Q11L/A191S) and 49 (S157C) are in blue. (B) Kinetic parameters with pNPA of wild-type PFEI and its variants.  $k_{cat}$  is represented versus  $K_M$ . Wild-type is colored in red, variant 34 (Q11L/A191S) and single mutants Q11L and A191S in blue and 14 (K87M) in green. pNPA, para-nitrophenyl acetate;  $T_m$ , melting temperature; WT, wild-type [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



Addition of L30P into the single variants Q11L and A191S and into the double variant Q11L/A191S caused a remarkable enhancement in stability. This effect was accompanied by the apparition of lactamase activity and the reduction in the activity with the model substrate pNPA (Table 2), as previously reported (Ding & Kazlauskas, 2017). In fact, L30P seems to be a promiscuous generalist (Khersonsky & Tawfik, 2010) showing esterase, lactonase (Ding & Kazlauskas, 2017; D. L. Yin et al., 2010), perhydrolase (D. T. Yin et al., 2013), and lactamase activities (Torres et al., 2012). In addition,  $T_m$  of Q11L/L30P/A191S was 3.5°C and 8.1°C higher than those of Q11L/A191S

and the wild-type enzyme, respectively. These results prove the additive effect of combining the three stabilizing mutations Q11L, L30P, and A191S into the same protein scaffold. Moreover, half-life at 75°C was drastically increased from 10 min for variant Q11L/A191S to 65 min for Q11L/L30P/A191S (Table 2).

**Table 2.** *Enantioselectivity in the kinetic resolution of the racemic Vince lactam, specific activity and thermal stability (Tm and half-life) of PFEI wild-type and its variants*

PFEI	E value <sup>a</sup>	Conversion of (–)-Vince lactamb	Tm (°C)	Half-life at 75°C (min)	Specific activity (U/mg)c
Wild-type	>100 (39%)	8.7	72.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	2723 ± 80
Q11L/A191S	>100 (35%)	13.0	77.3 ± 0.2	10.0 ± 0.4	2453 ± 69
L30P	>100 (27%)	98.5	77.0 ± 0.1	9 ± 1	54 ± 1
Q11L/L30P	n.d.	n.d.	77.7 ± 0.1	16 ± 1	45 ± 2
L30P/A191S	n.d.	n.d.	79.9 ± 0.1	41 ± 4	53 ± 2
Q11L/L30P/A191S	>100 (43%)	100	80.8 ± 0.1	65 ± 5	50 ± 2

Abbreviations: n.d., not determined; pNPA, para-nitrophenyl acetate; Tm, melting temperature.

<sup>a</sup>E values were calculated at the conversion indicated in parentheses.

<sup>b</sup>Conversion of (–)-Vince lactam after 2 hr at 37°C.

<sup>c</sup>Specific activity was determined with pNPA.

The stabilizing effect of the discovered mutations was also analyzed in terms of tolerance to organic solvents. All variants containing stabilizing mutations showed improved half-lives in the presence of 40% (vol/vol) ethanol and DMF (Figure 3a,b). The most thermostable variant, the triple mutant Q11L/L30P/A191S, resulted to be also the most resistant to organic solvents, with half-lives of

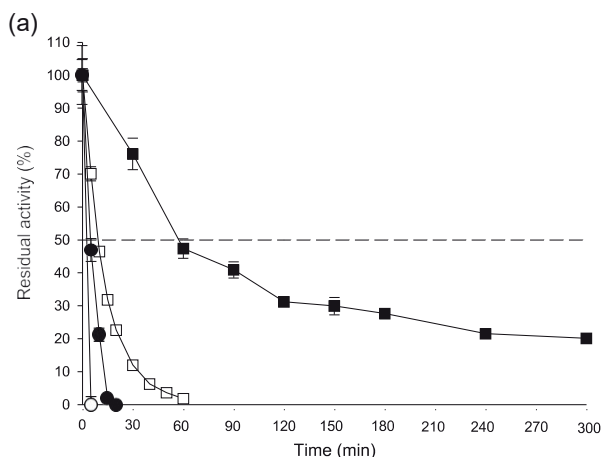
57 and 272 min with 40% ethanol and DMF, respectively, 23-fold and 60-fold higher when compared with the wild-type (2.5 min with 40% ethanol and 4.5 min with 40% DMF).

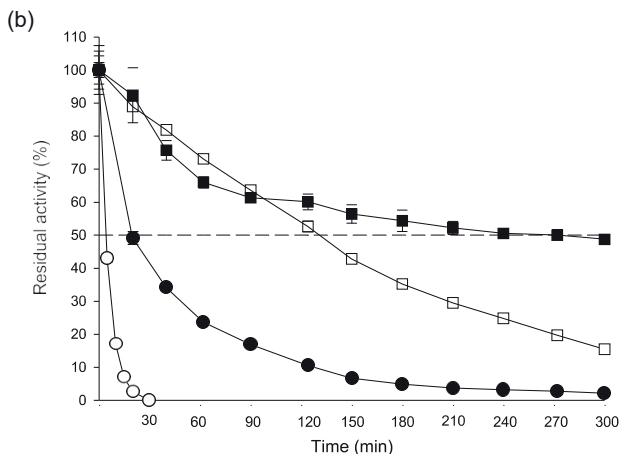
### 3.5 Structure–function analysis

Once activity and stability of selected variants were evaluated, we carried out a structural analysis of the found mutations. To this end, homology models of the most thermostable variant Q11L/L30P/A191S were built using the crystal structure of wild-type PFEI as a template (PDB code: 1VA4).

Gln11 is a surface-exposed residue located in the  $\beta$ -strand 2 (residues 9–17) that establishes two hydrogen bonds with the nearby Asp62 (Figure S4). Mutation to leucine at this position did not alter these interactions or gave rise to new ones. However, Leu11 generates a wide hydrophobic surface that could explain partial protein aggregation observed during purification of Q11L variants.

**Figure 3.** Residual activity of wild-type PFEI and its variants in the presence of 40% (vol/vol) ethanol (a) and DMF (b) at 42°C. White circles, wild-type; black circles, variant L30P; white squares, variant 34 (Q11L/A191S) and black squares, variant Q11L/L30P/A191S. DMF, N, N-dimethylformamide





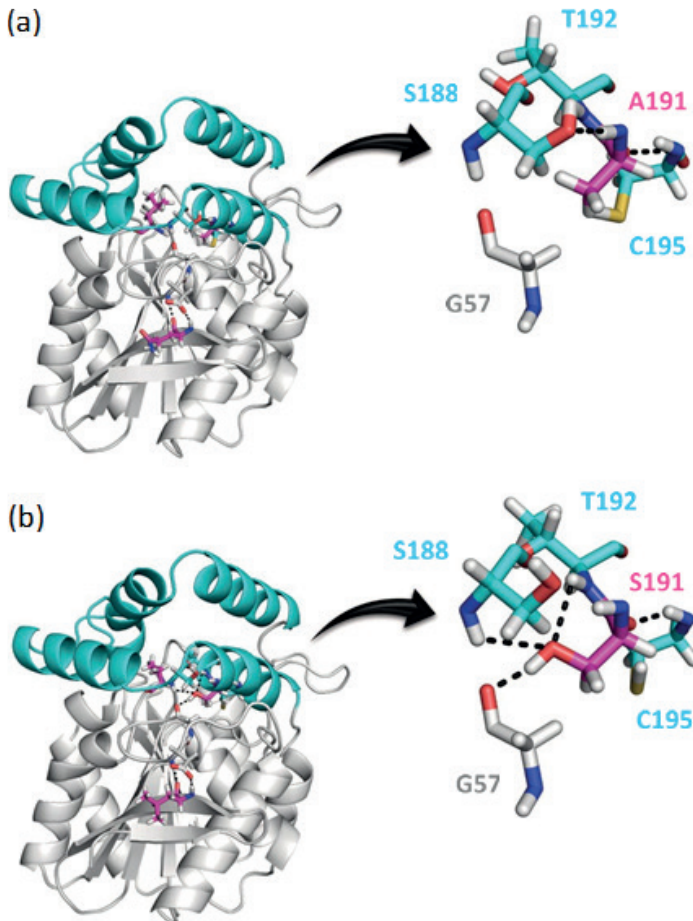
Leu30 is in the loop connecting the  $\beta$ -strand 3 and the  $\alpha$ -helix 1 (residues 26–33). As previously shown using molecular dynamics, L30P leads to the pyramidal inversion of the amide nitrogen (a requisite for amide hydrolysis) 500 times faster than in the wild-type (Torres et al., 2012). Furthermore, it was hypothesized that L30P could yield different distances between the carbonyl group of the adjacent Trp29 and the scissile amide nitrogen of the substrate, broadening in that way the substrate scope of PFEI.

Ala191 is placed in the  $\alpha$ -helix 7 (residues 189–201), which is one of the four  $\alpha$ -helices within the V-shaped hairpin formed by the  $\beta$ 6– $\beta$ 7 loop (Cheeseman, Tocilj, Park, Schrag, & Kazlauskas, 2004). This hairpin is topologically equivalent to the lid of *Pseudomonas* lipases (Schrag et al., 1997). In addition, Ala191 establishes hydrogen bonds with residues Ser188 and Cys195 in the wild-type PFEI. In the final variant Q11L/L30P/A191S, Ser191 keeps the interactions with Ser188 and Cys195 and forms additional hydrogen bonds with Gly57 and Thr192 (Figure 4). FoldX calculations gave rise to a  $\Delta\Delta G$  of  $-16$  kcal/mol for the final variant with respect to the wild-type, in line with the theoretical value for the contribution to the stability of two hydrogen bonds reported by Fleming and Rose (2005) ( $\sim 12$  kcal/mol). This hydrogen bond network could limit the mobility of



the  $\beta 6$ – $\beta 7$  loop, generating a more rigid and compact structure and thus explaining the increase in thermostability conferred by this mutation.

**Figure 4.** Detail of the stabilizing mutation A191S in variant Q11L/L30P/A191S (b) compared with the corresponding residues in the wild-type PFEI (a). The Q11L, L30P, and A191S mutations are depicted as pink sticks. Hydrogen bonds between residues are shown as black dashes. The V-shaped hairpin (residues 138–201) is displayed as cyan cartoon and the rest of the structure as a gray cartoon [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



## 4. Conclusions

Industrial organic syntheses require the availability of biocatalysts with high long-term stability and enantioselectivity towards the substrate of interest. The folding interference principle in *T. thermophilus* allowed the selection of mutations that seemingly stabilize the fusion protein PFEI-Kat, with only a small fraction of the discovered mutations able to stabilize the enzyme when it is expressed independently from the folding reporter. Even so, the method proved useful in the discovery of thermostabilizing mutations that would have been unpredictable otherwise. The best two stabilizing mutations found in the process, Q11L and A191S, conferred both improved thermal stability and higher resistance to organic solvents. Besides, when these mutations were incorporated into a highly enantioselective PFEI scaffold (L30P) the stability was increased even more, with a  $T_m$  over 80°C. Furthermore, improvement in thermal stability did not interfere with enantioselectivity towards the relevant precursor Vince lactam, since the triple variant, Q11L/L30P/A191S retained the (–) - $\gamma$ -lactamase activity and selectivity.

## Acknowledgments

This study was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grants BIO2008-01481 and BIO-2013-44963R). D. M. M. was supported by a Research Talent Attraction contract from the Community of Madrid (Ref. 2016-T2/BIO-1960). We thank Sandra Bosch (UAM) for her help with  $\Delta G$  calculations and Carmen Ortega (UAM) for her assistance with selection experiments in *Thermus thermophilus*. An institutional grant by Fundación Ramón Areces to CBMSO and a generous allocation of computing time at the Scientific Computation Center of the UAM (CCC-UAM) are also acknowledged.

## References

- Arnold, F. H. (1996). Directed evolution: Creating biocatalysts for the future. *Chemical Engineering Science*, 51, 5091–5102. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(96\)00288-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(96)00288-6)
- Beer, H.-D., Wohlfahrt, G., Schmid, R. D., & McCarthy, J. E. G. (1996). The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. *Biochemical Journal*, 319, 351–359. <https://doi.org/10.1042/bj3190351>
- Bommarius, A. S., & Paye, M. F. (2013). Stabilizing biocatalysts. *Chemical Society Reviews*, 42, 6534–6565. <https://doi.org/10.1039/c3cs60137d>
- Chautard, H., Blas-Galindo, E., Menguy, T., Grand'Moursel, L., Cava, F., Berenguer, J., & Delcourt, M. (2007). An activity-independent selection system of thermostable protein variants. *Nature Methods*, 4, 919–921. <https://doi.org/10.1038/nmeth1090>
- Cheeseman, J. D., Tocilj, A., Park, S., Schrag, J. D., & Kazlauskas, R. J. (2004). Structure of an aryl esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1107/S0907444904010522>
- Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., & Sih, C. J. (1982). Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, 104, 7294–7299. <https://doi.org/10.1021/ja00389a064>
- Choi, K. D., Jeohn, G. H., Rhee, J. S., & Yoo, O. J. (1990). Cloning and nucleotide sequence of an esterase gene from *Pseudomonas fluorescens* and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 2039–2045.

Coates, J. A. V., Inggall, H. J., Pearson, B. A., Penn, C. R., Storer, R., Williamson, C., & Cameron, J. M. (1991). Carbovir: The (–) enantiomer is a potent and selective antiviral agent against human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral Research*, 15, 161–168. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(91\)90033-n](https://doi.org/10.1016/0166-3542(91)90033-n)

Ding, Q. & Kazlauskas, R. J. (2017). Improving *Pseudomonas fluorescens* esterase for hydrolysis of lactones. *Catalysis Science & Technology*, 7, 4756–4765. <https://doi.org/10.1039/c7cy01770g>

Fisher, A. C. (2006). Genetic selection for protein solubility enabled by the folding quality control feature of the twin-arginine translocation pathway. *Protein Science*, 15, 449–458. <https://doi.org/10.1110/ps.051902606>

Fleming, P. J. & Rose, G. D. (2005). Do all backbone polar groups in proteins form hydrogen bonds? *Protein Science*, 14, 1911–1917. <https://doi.org/10.1110/ps.051454805>

Haki, G. & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89, 17–34. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00033-6)

Huang, J., Jones, B. J., & Kazlauskas, R. J. (2015). Stabilization of an  $\alpha/\beta$ -hydrolase by introducing proline residues: Salicylic acid binding protein 2 from tobacco. *Biochemistry*, 54, 4330–4341. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00333>

Jochens, H., Aerts, D., & Bornscheuer, U. T. (2010). Thermostabilization of an esterase by alignment-guided focussed directed evolution. *Protein Engineering, Design & Selection*, 23, 903–909. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq071>

Jochens, H., Stiba, K., Savile, C., Fujii, R., Yu, J., Gerassenskov, Bornscheuer, U. T. (2009). Converting an esterase into an epoxide hydrolase. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(19), 3532–3535. <https://doi.org/10.1002/anie.v48:19>

Jones, B. J., Lim, H. Y., Huang, J., & Kazlauskas, R. J. (2017). Comparison of five protein engineering strategies for stabilizing an  $\alpha/\beta$ -hydrolase. *Biochemistry*, 56, 6521–6532. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00571>

Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (2010). Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 471–505. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030409-143718>

Krieger, E., & Vriend, G. (2014). YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics*, 30, 2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>

Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J., & Magliery, T. J. (2009). High-throughput thermal scanning: A general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 3794–3795. <https://doi.org/10.1021/ja8049063>

Mate, D. M., Gonzalez-Perez, D., Mateljak, I., Gomez de Santos, P., Vicente, A. I., & Alcalde, M. (2016). The pocket manual of directed evolution: Tips and tricks. In G. Brahmachari (Ed.), *Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications* (pp. 185–213). Cambridge, MA: Academic Press Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803725-6.00008-x>

Matthews, B. W., Nicholson, H., & Becktel, W. J. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 6663–6667. <https://doi.org/10.2210/pdb1l23/pdb>

Schließmann, A., Hidalgo, A., Berenguer, J., & Bornscheuer, U. T. (2009). Increased enantioselectivity by engineering bo-

ttleneck mutants in an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *ChemBioChem*, 10, 2920–2923. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900563>

Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.-J., McPherson, A. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, 5, 187–202. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00178-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00178-0)

Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., & Serrano, L. (2005). The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Research*, 33, W382–W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41, 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>

Swarts, D. C., Jore, M. M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J. H., Snijders, A. P., van der Oost, J. (2014). DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*, 507, 258–261. <https://doi.org/10.1038/nature12971>

Takahashi, S., Ueda, M., & Tanaka, A. (1999). Independent production of two molecular forms of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by KEX2-engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 534–540. <https://doi.org/10.1007/s002530051556>

Torres, L. L., Schließmann, A., Schmidt, M., Silva-Martin, N., Hermoso, J. A., Berenguer, J., ... Hidalgo, A. (2012). Promiscuous enantioselective (–) -  $\gamma$ -lactamase activity in the *Pseudomonas fluorescens* esterase I. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10, 3388–3392. <https://doi.org/10.1039/c2ob06887g>

Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., & Terwilliger, T. C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluores-

cent protein. *Nature Biotechnology*, 17, 691–695. <https://doi.org/10.1038/10904>

Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H., & Suzuki, Y. (1994). Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, 226, 277–283. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20051.x>

Wong, T., Zhurina, D., & Schwaneberg, U. (2006). The diversity challenge in directed protein evolution. *CCHTS*, 9, 271–288. <https://doi.org/10.2174/138620706776843192>

Yin, D. L., Bernhardt, P., Morley, K. L., Jiang, Y., Cheeseman, J. D., Purpero, V., ... Kazlauskas, R. J. (2010). Switching catalysis from hydrolysis to perhydrolysis in *Pseudomonas fluorescens* esterase. *Biochemistry*, 49, 1931–1942. <https://doi.org/10.1021/bi9021268>

Yin, D. T., Purpero, V. M., Fujii, R., Jing, Q., & Kazlauskas, R. J. (2013). New structural motif for carboxylic acid perhydrolyses. *Chemistry*, 19, 3037–3046. <https://doi.org/10.1002/chem.201202027>

## Listado de docentes investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador

Dr. Roberto Vásquez Zelaya

Hemato-Oncólogo pediatra.

Director de la Clínica de Hemato-Oncología Pediátrica del Hospital de Niños Benjamín Bloom

Docente del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina.

Correo institucional: roberto.vasquez2@ues.edu.sv

Dra. Ana Concepción Guadalupe Polanco Anaya

Patóloga pediatra

Jefe de Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom

Docente del Departamento de Patología, Facultad de Medicina.

Correo institucional: ana.polanco@ues.edu.sv

MSc. Brenda Iliana Gallegos López

Docente de la Carrera de Nutrición, Facultad de Medicina

Correo institucional: brenda.gallegos@ues.edu.sv

Dr. Rafael Antonio Orellana Cornejo

Internista Endocrinólogo

Docente del Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina

Correo institucional: rafael.orellana@ues.edu.sv

MSc. Jesica Yasmín López Villalta

Licenciada en Fisioterapia y Terapia Ocupacional

Docente de la Carrera de Fisioterapia y Terapia Ocupacional, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina

Correo institucional: jesica.lopez@ues.edu.sv

MSc. Mónica Raquel Ventura

Licenciada en Anestesiología y Terapia Respiratoria

Docente de la Unidad de Ciencias Básicas de la Escuela de Ciencias de la Salud



Correo institucional: monica.ventura@ues.edu.sv

Dr. Edwin Mazariego Flores

Licenciado en Laboratorio Clínico, Dr. En Educación

Docente de la Unidad de Ciencias Básicas de la Escuela de Ciencias de la Salud.

Correo institucional: edwin.mazariego@ues.edu.sv

Dr. Carlos Alexander Ortega Pérez

Doctor en Medicina

Docente del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina

Correo institucional: carlos.ortega@ues.edu.sv

Dr. Antonio Vásquez Hidalgo

Doctor en Medicina

Docente del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina

Correo institucional: antonio.vasquez@ues.edu.sv

Dr. Noé Rigoberto Rivera

Doctor en Medicina. Doctor en Biología Molecular

Director de la Unidad de Investigación Científica, Facultad de Medicina

Correo institucional: noe.rivera@ues.edu.sv

## BIBLIOGRAFÍA

1. Salaverria C, Plenert E, Vasquez R, Fuentes-Alabi S, Tomlinson GA, Sung L. Paediatric relapsed acute leukaemia: Curative intent chemotherapy improves quality of life. *BMJ Support Palliat Care*. 2021;(Lmic):1–8.
2. Soad Fuentes-Alabi, MD, MPH1; Nickhill Bhakta, MD, MPH2; Roberto Franklin Vasquez, MD1; Sumit Gupta, MD, PhD, FR-CPC 3, 4; and Susan E. Horton, BA, MA P. The cost and cost-effectiveness of childhood cancer treatment in El Salvador Central.pdf. 2018. p. 391–7.
3. Rossell N, Salaverria C, Hernandez A, Alabi S, Vasquez R, Bonilla M, et al. Community resources support adherence to treatment for childhood cancer in El Salvador. *J Psychosoc Oncol* [Internet]. 2018;36(3):319–32. Available from: <https://doi.org/10.1080/07347332.2018.1427174>
4. Francesco Ceppi, MD, 1\* Roberta Ortiz, MD, 2 Federico Antillon, MD, 3 Roberto Vasquez, MD, 4 Wendy Gomez, MD, 5 Jessica Gamboa, MD, 6 Claudia Garrido, MD, 3 Guillermo Chantada, MD, 7, 8 Armando Peña, MD, 9 and Sumit Gupta, MD P, 1. Anaplastic Large Cell Lymphoma in Central America: A Report From the Central American Association of Pediatric Hematology Oncology (AHOPCA). *Pediatr Blood Cancer*. 2015;(August):78–82.
5. Carmen Salaverria, MSc, 1\* Nuria Rossell, MSc, 1, 2 Angelica Hernandez, RN, 1 Soad Fuentes Alabi, MD, 1 Roberto Vasquez, MD, 1 Miguel Bonilla, MD, 3 Catherine G. Lam, MD, 3, 4, 5 and Raul C. Ribeiro M, 4 5 Background. Interventions Targeting Absences Increase Adherence and Reduce Abandonment of Childhood Cancer Treatment in El Salvador. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;(April):1388–9.
6. Gavidia R, Fuentes SL, Vasquez R, Bonilla M, Ethier MC, Diorio C, et al. Low socioeconomic status is associated with prolonged

- times to assessment and treatment, sepsis and infectious death in pediatric fever in El salvador. PLoS One. 2012;7(8).
7. Marjerrison S, Antillon F, Fu L, Martinez R, Vasquez R, Bonilla M, et al. Outcome of children treated for relapsed acute lymphoblastic leukemia in Central America. *Cancer*. 2013;119(6):1277–83.
  8. Avram E. Denburg, MD, Msc, 1 Steven Joffe, MD, MPH, 2 Sumit Gupta, MD, 1, 3 Scott C. Howard, MD, MS, 4 Raul C. Ribeiro, MD, 4 Federico A. Antillon, MD, PhD, 5 Roberto Vasquez, MD, 6 and Lillian Sung, MD P, 1 3\*. Pediatric Oncology Research in Low Income Countries: Ethical Concepts and Challenges. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;(April):492–7.
  9. Carlo Alfredo Clerici, MD, Maura Massimino, MD, Michela Casanova, MD, Graziella Cefalo, MD, Monica Terenziani, MD, Roberto Vasquez, MD, Cristina Meazza, MD, and Andrea Ferrari M. Psychological Referral and Consultation for Adolescents and Young Adults With Cancer Treated at Pediatric Oncology Unit. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;(November):105–109.
  10. Roberto Vasquez, MD, 1 Paola Collini, MD, 2 Cristina Meazza, MD, 1 Francesca
  11. Favini, MD 1, Michela Casanova, MD, 1 and Andrea Ferrari M 1\*. Late Relapse of Embryonal Rhabdomyosarcoma, Botryoid Variant, of the Vagina. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;(February):1388–9.
  12. Santiago T, Polanco AC, Fuentes-Alabi S, Hayes C, Orellana E, Gomero B, et al. Multinational retrospective central pathology review of neuroblastoma: Lessons learned to establish a regional pathology referral center in resource-limited settings. *Arch Pathol Lab Med*. 2021;145(2):214–21.
  13. Moreira DC, Rajagopal R, Navarro-Martin del Campo RM, Polanco AC, Alcasabas AP, Arredondo-Navarro LA, et al. Brid-

ging the Gap in Access to Care for Children With CNS Tumors Worldwide. *JCO Glob Oncol*. 2020;(6):583–4.

14. Hayes C, Santiago T, Polanco AC, Miranda L, Aybar A, Gomero B, et al. Improving immunohistochemistry capability for pediatric cancer care in the Central American and Caribbean region: A report from the AHOPCA Pathology Working Group. *J Glob Oncol*. 2018;2018(4):1–9.
15. Dr. Eric Martínez Torres 1, Dra. Ana Concepción Polanco Anaya2 y Dr. Ernesto Benjamín Pleites Sandoval3. ¿Por qué y cómo mueren los niños con dengue? 2008;60(1):40–7.
16. Salvador E, Concepción A, Anaya P, Salvador E. Informe de caso Pericarditis aguda y taponamiento cardiaco por. *Patología (Mex)*. 2011;49(1):37–42.
17. Mejia LA, Núñez MJ, Gallegos B, Cuadra JA, Castillo UG. “Atol Shuco”, a Traditional Corn-Fermented Salvadorian Beverage: Phytochemical, Microbiological and Nutritional Considerations. *ACS Symp Ser*. 2022;1406:29–48.
18. Puertas EB, Orellana RA, Muñoz BE, Jiménez JA, Quiroz IGM, Terrón L, et al. Factores que influyen en la elección de una carrera en atención primaria entre los estudiantes de medicina en América Central. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2020;44(1):1–10.
19. López JY, González G, Salvador UD El. Aproximaciones teóricas Development of Investigative Competences in the undergraduate . Theoretical approaches Resumen. 2022;10(1):34–48.
20. Ventura MR. Factores de riesgo y factores de protección asociados al ingreso, permanencia y abandono de jóvenes a la pandilla o mara. Vivencias e interpretaciones de sus actores. *Ciencia, Cult y Soc*. 2017;4(1):15–23.

21. Flores EM. Cooperación científica del claustro docente para guiar las investigaciones de la Maestría en Salud Pública de la Facultad de Medicina. 2022;22(1):51–9.
22. Flores EM, Sánchez MC. Experiencia y percepción investigativa de los docentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador. *Rev Estud del Desarro Soc en Cuba y América Lat.* 2022;10(1).
23. Flores EM. La cooperación científica para la asesoría de tesis-tas del posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-LEÓN. *La Univ.* 2021;(2020):72–8.
24. Flores EM. La legislación de la educación superior y la formación de profesionales en El Salvador. *Rev La Univ.* 2021;72–8.
25. Ortega-Pérez CA, Costa-Júnior ML da, Vasters GP. Perfil epidemiológico de la drogadicción en estudiantes universitarios. *Rev Latino-Am Enferm.* 2011;19(spe):665–72.
26. Orellana-Cornejo RA, Rodríguez-Funes MV. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, síndrome metabólico e hiperruricemia en personal docente y administrativo de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador en el año 2018. *Alad.* 2019;9(4):2–10.
27. Fontenay M. R esumen. *Scielo.* 2016;1:1–34.
28. Rivera NR, Ortega Perez C, López XS, AlexanderHernandez Avila CE. Primeras seis secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 por NGS en El Salvador. *Alerta, Rev científica del Inst Nac Salud.* 2021;4(1):61–6.
29. Ortega Pérez CA, Rivera NR, López XS, Hernandez Avila CE. Análisis de la mutación D614G encontrada en secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador. *Alerta, Rev científica del Inst Nac Salud.* 2021;4(1):72–7.

30. Rivera NR, Pérez CO, Sandoval López X, Hernández Ávila CE. Muestra de saliva para diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en población ambulatoria. *Alerta, Rev científica del Inst Nac Salud*. 2021;4(2):38–45.
31. Pérez<sup>1</sup> CAO, Rivera<sup>2</sup> NR, López XS, Enrique C, Ávila H. Origen del perfil de mutaciones presente en las secuencias de SARS-CoV-2 en El Salvador Origin of the mutation profile present in SARS-CoV-2 sequences in El Salvador. 2022;5:9–22.
32. Mate DM, Rivera NR, Sanchez-Freire E, Ayala JA, Berenguer J, Hidalgo A. Thermostability enhancement of the *Pseudomonas fluorescens* esterase I by in vivo folding selection in *Thermus thermophilus*. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117(1):30–8.

*Se imprimió  
en la Imprenta Universitaria  
de la Universidad de El Salvador,  
en noviembre de dos mil veintidós.  
Final Avenida "Mártires Estudiantes  
del 30 de julio", Ciudad Universitaria.  
San Salvador, El Salvador, Centro América.  
Teléfono: (503) 2511-2039.  
Tiraje: 500 ejemplares.*



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**EDITORIAL UNIVERSITARIA**

