

# MEDICINA · BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADEMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

Cambios en la distribución etaria de los casos de gripe B  
observados en la Comunidad balear  
en dos temporadas epidémicas recientes (2012/13 y 2014/15)

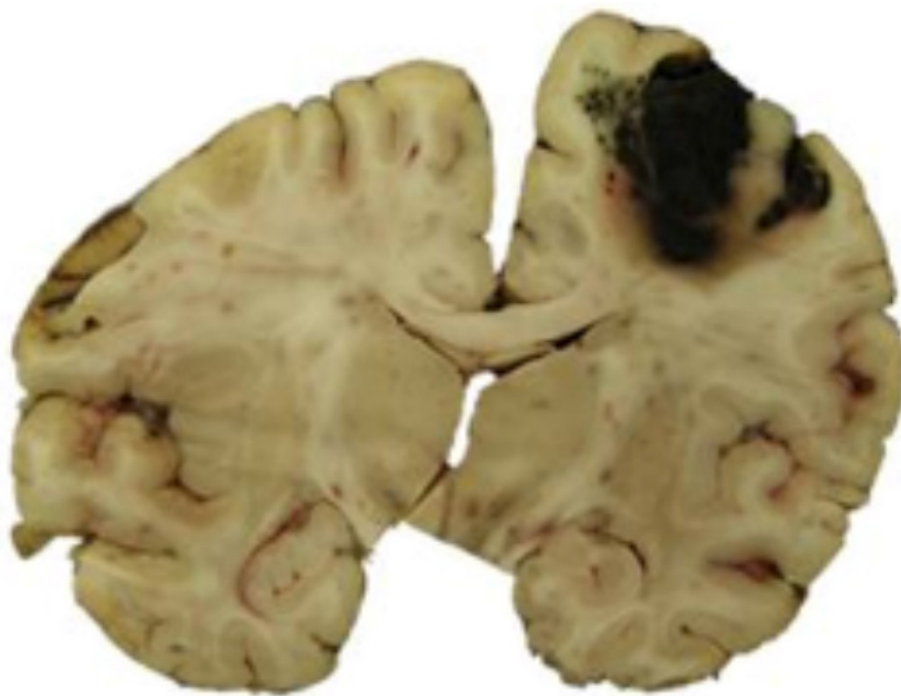
Nomograma predictivo de hiperglucemia.  
Aplicación en población trabajadora

Apoptotic and necrotic basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spines alteration  
after acute and long-term chlorpyrifos exposure: legal implications of the use of toxicogenomic  
profile as a biomarker of harmful effects induced under subclinical doses

Toxicidad medioambiental. Regulación legislativa y repercusiones en salud

Hipercalcèmia per hiperparatiroidisme primari

Varón de 53 años inmunodeprimido con fiebre e infiltrado pulmonar bilateral



**Medicina Balear**, òrgan de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears, va aparèixer el 1986 amb l'objectiu de donar curs a les inquietuds científiques i fomentar l'esperit d'investigació dels professionals de la sanitat balear i amb la pretensió suplementària de projectar en la societat temes d'interès sanitari.

**Medicina Balear** publica en català, castellà o anglès treballs originals, articles de revisió, cartes al director i altres escrits d'interès relacionats amb les ciències de la salut i presta particular atenció als treballs que tinguin per àmbit les Illes Balears i altres territoris de la conca mediterrània occidental. La revista sotmet els originals a la revisió anònima per al menys dos experts externs (peer review).



El material científic publicat a **Medicina Balear** resta protegit per drets d'autor. **Medicina Balear** no és responsable de la informació i opinions dels autors.

Aquesta obra -llevat que s'indiqui el contrari en el text, en les fotografies o en altres il·lustracions- és subjecta a la llicència de Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 Espanya de Creative Commons; <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>. Així, doncs, s'autoritza al públic en general a reproduir, distribuir i comunicar l'obra sempre que se'n reconegui l'autoria i l'entitat que la publica i no se'n faci un ús comercial ni cap obra derivada.

**Medicina Balear** es troba incorporada a la Biblioteca Digital de les Illes Balears, de la Universitat de les Illes Balears, i està inclosa en les bases de dades següents: Latindex (catàleg), Dialnet, Índice Médico Español, DOAJ, Imbiomed



IME  
Índice  
Médico  
Español



DOAJ  
DIRECTORY OF  
OPEN ACCESS  
JOURNALS



## EDITA

Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears



[www.ramib.org](http://www.ramib.org)

Campaner, 4, baixos. 07003 Palma de Mallorca Tel. 971 72 12 30 Email: [info@ramib.org](mailto:info@ramib.org)  
Pàgina web: <http://www.ramib.org>

Dipòsit Legal: PM 486 - 95

eISSN: 2255 - 0569

## Disseny i maquetació

Intelagencia Publicitat - [www.intelagencia.es](http://www.intelagencia.es) - [intelagencia@intelagencia.es](mailto:intelagencia@intelagencia.es)

# MEDICINA · BALEAR

Publicació quadrimestral de ciències de la salut de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears

**Director** A. Arturo López González, *RAMIB*,  
Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears (*RAMIB*)

## CONSELL EDITORIAL

---

**Subdirector** Joan March Noguera, *RAMIB*  
**Editor científic** Marta Couce Matovelle, *Case Western Reserve University*  
**Assessors editorials** José A. Guijarro Pastor, *AEMET* · Jaume Rosselló Mir, *UIB*  
**Redactor en cap** J. L. Olea Vallejo, *RAMIB*  
**Vocals** Antoni Aguiló Pons, *Universitat de les Illes Balears* · Bartolomé Burguera González, *Cleveland Clinic (Ohio)* · Amador Calafat Far, *Socidrogalcohol* · Carlos Campillo Artero, *Universitat Pompeu Fabra* · Valentín Esteban Buedo, *Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana* · Carmen González Bosch, *Universitat de València* · Miguel A. Limon Pons, *Institut Menorquí d'Estudis* · Virgili Páez Cervi, *Bibliosalut* · Lucio Pallarés Ferreres, *Hospital Son Espases, Ibsalut* · Ignacio Ricci Cabello, *University of Oxford* · Guillermo Sáez Tormo, *Universitat de València* · M<sup>a</sup> Teófila Vicente Herrero, *IUNICS*

## CONSELL CIÈNTIFIC

---

M<sup>a</sup> José Anadón Baselga (*Universidad Complutense de Madrid*), Miquel Capó Martí (*Universidad Complutense de Madrid*), Antonio Coca Payeras (*Universitat de Barcelona*), James Drane (*Edinboro University*), Leopoldo Forner Navarro (*Universitat de València*), Alexandre García-Mas, (*Universitat de les Illes Balears*), Antoni Gelabert Mas (*Universitat Autònoma de Barcelona*), Joan Grimalt Obrador (*Consell Superior d'Investigacions Científiques, CSIC*), Federico Hawkins Carranza (*Universidad Complutense de Madrid*), Joan Carles March Cerdà (*Escuela Andaluza de Salud Pública, EASP*), Gabriel Martí Amengual (*Universitat de Barcelona*), Jasone Monasterio Aspiri (*Universitat Autònoma de Barcelona*) Rosa Pulgar Encinas (*Universidad de Granada*), Ciril Rozman (*Universitat de Barcelona*).

## Amb la col·laboració de

  
**Govern de les Illes Balears**  
Conselleria de Presidència

Fundació  
**Patronat Científic**  
  
Col·legi de Metges  
Illes Balears

[www.medicinabaleaar.org](http://www.medicinabaleaar.org)



# PREMIOS, BECAS Y AYUDAS

## PREMIOS DE INVESTIGACIÓN, convocatoria 2016

La **Fundació Patronat Científic** convoca los **Premios de Investigación Mateu Orfila, Damià Carbó y Metge Matas** con la finalidad de premiar la **trayectoria de la investigación en Ciencias de la Salud** en nuestra comunidad.

Más info en:



## PREMIO MUTUAL MÉDICA AL MEJOR PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

El premio tiene como finalidad **facilitar a los médicos colegiados** en Illes Balears la **obtención del título de Doctor**. Con el patrocinio de **Mutual Médica**.

Más info en:



## BECAS BANC SABADELL DE ROTACIÓN EXTERNA PARA MÉDICOS RESIDENTES

Facilitar a los médicos que realicen la residencia en hospitales de Balears la **formación**, al menos durante un mes, en **centros hospitalarios nacionales y extranjeros**, en el último año de la residencia o al terminar la misma.

Más info en:



## BECAS DE INNOVACIÓN PARA MÉDICOS COLEGIADOS, EXCEPTO MIR

Tienen como objetivo facilitar a los médicos colegiados en les Illes Balears, excepto MIR, la **formación**, durante **al menos un mes**, en **centros sanitarios nacionales y extranjeros en técnicas diagnósticas o terapéuticas**.

Más info en:



## AYUDAS PARA PUBLICACIONES MÉDICAS EN INGLÉS

Proporcionar ayuda a los médicos colegiados en Illes Balears la **publicación de artículos científicos** en revistas editadas **en lengua inglesa**.

Más info en:



# MEDICINA • BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADÈMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

[www.medicinabaleaer.org](http://www.medicinabaleaer.org)

## SUMARI

### EDITORIAL

- Zika: alerta, prevenció y calma. Tres en uno** ————— 8-9  
Joan Carles March Cerdá

### ORIGINALS

- Cambios en la distribución etaria de los casos de gripe B observados en la Comunidad balear en dos temporadas epidémicas recientes (2012/13 y 2014/15)** ——— 11-15

Jordi Reina, Antonio Iñigo, Francesc Ferrés, Victoria Fernández-Corominas, Joan Vidal, Jaume Giménez y Red Centinela de Vigilancia de la Gripe (RCVG) de Baleares

- Nomograma predictivo de hiperglucemia. Aplicación en población trabajadora** ——— 16-23

M<sup>a</sup>. Teófila Vicente-Herrero, Cristina Santamaría Navarro, Belén García-Mora, Carlos Sánchez Juan

- Muerte de neuronas colinérgicas de la región basal por necrosis y apoptosis, así como alteración de la densidad de espinas dendríticas tras la exposición aguda y a largo plazo a clorpirifos: implicaciones legales del uso del perfil toxicogenómico como biomarcador de efectos dañinos inducidos a dosis subclínicas** ——— 24-34

Paula Moyano, Javier del Pino, María José Anadón, José Manuel García, María Jesús Díaz, Gloria Gómez, Jimena García, María Teresa Frejo, Miguel Andrés Capó

### REVISIÓ

- Toxicidad medioambiental. Regulación legislativa y repercusiones en salud** ——— 35-42

Luisa Capdevila García, M<sup>a</sup> Victoria Ramírez Iñiguez de la Torre, J. Ignacio Torres Alberich, M<sup>a</sup> Jesús Terradillos García

### ESTUDI DE CASOS

- Hipercalcèmia per hiperparatiroidisme primari** ————— 43-46

Emili Navalón Ramon

- Varón de 53 años inmunodeprimido con fiebre e infiltrado pulmonar bilateral** ——— 47-51

Inés Herráez Balanzat, Rafael Ramos Asensio, Julia Moreno Sánchez, Leyre Bento de Miguel, Manuel del Río Vizoso

# Seguro de Automóvil



## Porque cuando se queda sin coche, es cuando más ayuda necesita



### Así funcionan nuestras nuevas coberturas exclusivas:

¿Tiene un problema con el coche y necesita que alguien le acerque al taller?

**Nosotros lo hacemos**

¿No sabe cómo volver a casa después?

**Nosotros le llevamos**

Y en caso de siniestro total, ¿cómo va a moverse?

**Con el coche de sustitución que A.M.A. pondrá a su disposición**

**Así de fácil y así de claro.**

Confíe en la experiencia de A.M.A. y disfrute del mejor servicio con total tranquilidad.

**A.M.A. PALMA DE MALLORCA** Barón de Pinopar, 10 Tel. 971 71 49 82 pmallorca@amaseguros.com



**LA CONFIANZA ES MUTUAL**  
**www.amaseguros.com 902 30 30 10**



# MEDICINA • BALEAR

SCIENTIFIC JOURNAL OF THE ROYAL ACADEMY OF MEDICINE OF THE BALEARIC ISLANDS

www.medicinabaleaer.org

## CONTENTS

### EDITORIAL

- Zika: warning, prevention and calm. Three in one** ————— 8-9  
Joan Carles March Cerdá

### ORIGINAL ARTICLES

- Age-distribution changes in influenza B cases in two recent epidemic seasons (2012/13 and 2014/15) observed in the Balearic Community** — 11-15

Jordi Reina, Antonio Iñigo, Francesc Ferrés, Victoria Fernández-Corominas, Joan Vidal, Jaume Giménez y Red Centinela de Vigilancia de la Gripe (RCVG) de Baleares

- Hyperglycemia predictive nomogram. Working population application** ————— 16-23

M<sup>a</sup>. Teófila Vicente-Herrero, Cristina Santamaría Navarro, Belén García-Mora, Carlos Sánchez Juan

- Apoptotic and necrotic basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spines alteration after acute and long-term chlorpyrifos exposure: legal implications of the use of toxicogenomic profile as a biomarker of harmful effects induced under subclinical doses** ————— 24-34

Paula Moyano, Javier del Pino, María José Anadón, José Manuel García, María Jesús Díaz, Gloria Gómez, Jimena García, María Teresa Frejo, Miguel Andrés Capó

### REVIEW

- Environmental toxicity. Legislative regulation and health impact** ————— 35-42

Luisa Capdevila García, M<sup>a</sup> Victoria Ramírez Iñiguez de la Torre, J. Ignacio Torres Alberich, M<sup>a</sup> Jesús Terradillos García

### CASE STUDIES

- Hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism** ————— 43-46

Emili Navalón Ramon

- 53 years old male immunosuppressed with fever and bilateral pulmonary infiltrate** — 47-51

Inés Herráez Balanzat, Rafael Ramos Asensio, Julia Moreno Sánchez, Leyre Berto de Miguel, Manuel del Río Vizoso

## Zika: alerta, prevención y calma. Tres en uno

*Zika: warning, prevention and calm. Three in one*

**Joan Carles March Cerdá**

*Director de la Escuela Andaluza de Salud Pública*

### 1. Las alertas:

El 7 de mayo de 2015, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitió una alerta sobre la posible transmisión de virus Zika en el noreste de Brasil. Esto fue confirmado por la amplia propagación de la enfermedad, lo que subrayaba el potencial del virus Zika para que se pudiera extender a nivel mundial, de forma similar al dengue y al virus chikungunya.

El 1 de febrero, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una alerta sobre las posibles consecuencias fetales del brote de virus Zika después de que las autoridades brasileñas informaron de un aumento anormal en el número de casos de recién nacidos que nacían con microcefalia.

Desde entonces, según la OPS, 20 países ya han informado de la detección del zika en su territorio: Barbados, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Guyana, la Guayana Francesa, Haití, Honduras, Martinica, México, Panamá, Paraguay, Puerto Rico, la isla de San Martín, Surinam y Venezuela. Pero la OPS señala que el recuento crece cada día y considera que acabará llegando a todos los países de América Latina.

Pero, los casos vienen de antes. El virus del Zika fue aislado por primera vez de un mono Rhesus en Uganda, en 1947. Este arbovirus está relacionada con el dengue y tienen una epidemiología similar y el ciclo de transmisión en entornos urbanos. Hasta hace poco, sólo se habían informado de infecciones por el virus del zika en humanos de forma muy esporádica. En 2007, se encontró por primera vez el virus del Zika fuera de Asia y África y posteriormente, causó una epidemia en la isla de Yap en los Estados Federados de Micronesia, que fue seguido por una gran epidemia en la Polinesia francesa en 2013-14. Posteriormente, se extendió el virus del Zika a varios países de Oceanía.

Durante los brotes de la enfermedad por el virus de Zika en 2013 en la Polinesia Francesa y 2015 en el Brasil, las autoridades sanitarias nacionales notificaron potenciales complicaciones neurológicas y autoinmunes de la enfermedad del virus Zika. Recientemente en Brasil, las autoridades sanitarias locales observaron también un aumento del síndrome de Guillain-Barré coincidiendo con



un brote de la enfermedad, así como un aumento en los bebés nacidos con microcefalia en el noreste del país. Por tanto, los organismos que están investigando los brotes por este virus plantean que son necesarias más investigaciones para entender mejor la posible relación. Debe mencionarse, que a diferencia de otras arbovirosis, existen evidencias de que Zika puede potencialmente transmitirse también sexualmente.

Para que las alertas estén basadas en los hechos, es necesario mayor investigación y vigilancia.

### 2. Prevención:

La enfermedad por el virus Zika es una enfermedad infecciosa que se transmite por mosquitos del género *Aedes*. En general, la enfermedad produce síntomas leves en el ser humano y, de hecho, la mayoría de las personas que se infectan no manifiestan ningún síntoma. La principal preocupación alrededor de este virus se ha producido por la descripción de cuadros neurológicos tipo Síndrome de Guillain Barré y anomalías congénitas (microcefalia) en recién nacidos de madres que, durante la gestación, tuvieron infección por virus Zika, lo que convierte a las embarazadas en el grupo de mayor riesgo.

En España existe la posibilidad de introducción de este virus a través de personas infectadas procedentes de países donde existe transmisión, de hecho se han notificado ya varios casos importados en diferentes comunidades autónomas. Hay que tener en cuenta que España tiene una estrecha relación con las zonas en las que se está registrando una alta incidencia de la enfermedad. Además, uno de los vectores competentes para la trans-



misión del virus Zika, el mosquito *Aedes albopictus*, está presente en parte del territorio español (fundamentalmente en la costa mediterránea). Por ello, no se puede descartar que se pueda producir algún caso autóctono en nuestro país en los meses en los que este mosquito está presente (en general entre mayo y noviembre). Sin embargo, hay que tener en cuenta que para que se produzca un caso autóctono, debe coincidir en el espacio y en el tiempo un caso en fase virémica y un vector competente que le pique y a su vez sea capaz de transmitir el virus a otra persona. En este momento, debido a que estamos en periodo invernal, el riesgo de que se produzca algún caso autóctono en España puede considerarse prácticamente nulo dada la dudosa actividad vectorial.

En este momento, las recomendaciones y acciones de prevención deben ir dirigidas a las personas que van a viajar a las zonas de riesgo, teniendo en cuenta de forma especial a las mujeres embarazadas. Los viajeros a estas zonas deben tomar medidas de protección individual frente a la picadura de mosquitos, y deben estar concienciados de la importancia de acudir a los servicios sanitarios a la vuelta de su viaje si presentan síntomas compatibles con la enfermedad, y en el caso de las embarazadas, además, mencionar el viaje en las revisiones prenatales para que sean evaluadas adecuadamente.

La prevención y el control de la propagación del virus dependen de la reducción del número de mosquitos a través de la reducción de sus fuentes (eliminación y modificación de los lugares de cría) y de la disminución de los contactos entre los mosquitos y las personas.

Para evitar las picaduras conviene utilizar repelentes de insectos regularmente, ponerse ropa que cubra al máximo el cuerpo, utilizar barreras y si fuera necesario utilizar protección personal adicional, como dormir con mosquiteros durante el día. También es sumamente importante vaciar, limpiar o cubrir regularmente los contenedores que puedan acumular agua, como cubos, barriles, macetas, etc. Se deberían limpiar o eliminar otros posibles criaderos de mosquitos, como macetas, neumáticos usados y canalones.

Hay que prestar especial atención y ayuda a quienes no pueden protegerse adecuadamente por sí solos, como los niños, los enfermos o los ancianos. Asimismo, la prevención a nivel sexual, es otro aspecto a tener en cuenta

Ante ello, vigilancia específica de la enfermedad por este virus a través, entre otros de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y la puesta en marcha de un protocolo de vigilancia de esta enfermedad e información a profesionales sanitarios y ciudadanía, con acciones coordinadas de los gobiernos central, autonómico y local, con concienciación individual de cada una de las personas en aspectos de prevención y control, en un abordaje integral que contemple la coordinación de los diferentes sectores implicados.

### 3. Calma:

Por todo ello, consideramos importante, zika y calma, tranquilizando a la población residente en nuestro país, dado que el riesgo de transmisión del virus Zika en este momento es prácticamente nulo y están en marcha las medidas oportunas para minimizar el riesgo asociado a la importación de casos en las zonas y períodos donde puede circular el mosquito vector.

#### En conclusión:

Las enfermedades emergentes siguen retándonos y debe por ello incrementarse la capacitación en las mismas, la preparación en el ámbito asistencial, en el campo de la salud pública y en también en investigación.

El futuro del zika es impredecible, pero la difusión mundial del Dengue y chikungunya y su estrecha ligazón a las tendencias de la urbanización y la globalización, sugiere que el virus del Zika tiene el potencial de seguir su camino. Ante ello, vigilancia y alerta, prevención e información y mientras tanto, calma.

1. Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica. Zika De mayo de 2015.

2. OMS. Declaración de la OMS sobre la primera reunión del Reglamento Sanitario Internacional (2005) (RSI 2005) Comité de Emergencia sobre el virus Zika y aumento observado en los trastornos neurológicos y malformaciones neonatales. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1º-emergencia-comité-zika/es/>

3. Correspondance de Myrielle Dupont-Rouzeyrol, Antoine Biron, Olivia O'Connor, Emilie Huguon, Elodie Descloux Infectious Zika viral particles in breastmilk. [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(16\)00625-5.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(16)00625-5.pdf)

4. Schuler-Faccini, L, Ribeiro, EM, Feitosa, IML y col. Posible asociación entre la infección por el virus Zika y microcefalia-Brasil, 2015. *Morb Mortal Wkly Rep* . 2016 ; 65 : 59-62

5. Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Evaluación del riesgo rápido: Zika brote de infección por el virus . EDCD

6. DECLARACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE EPIDEMIOLOGÍA SOBRE LA ENFERMEDAD POR VIRUS ZIKA <http://www.seepidemiologia.es/documents/dummy/COMUNICADOSEE.ZIKA.pdf>

# ■ ■ | Siempre, estaremos a su lado



Para ocuparnos de su salud en su crecimiento, en su juventud y en todas las etapas de la vida.

Esa es una realidad para cuantos han nacido con nosotros y siguen confiando a ASISA el cuidado de su salud.

Para ASISA es una satisfacción y un estímulo que queremos compartir con cuantos integran nuestro cuadro médico. Es una forma de entender la asistencia sanitaria que nos distingue y constituye una de las señas de identidad de nuestra Compañía.

- asisa **salud**
- asisa **plus**
- asisa **autónomos**
- asisa **empresas**
- asisa **dental**
- asisa **hospitalización**
- asisa **accidentes**
- asisa **previsión**

Y ahora también:

**asisa**  
*vida*

**asisa**   
**Somos médicos**

asisa Baleares Pere Dezcallar i Net, 10 • 07010 Palma de Mallorca • Tels: 971 72 24 46/ 971 71 46 84 • e-mail: [jvillar@asisa.es](mailto:jvillar@asisa.es)

asisa contrata 901 10 10 10 | asisa informa 902 010 010 | [asisa.informacion@asisa.es](mailto:asisa.informacion@asisa.es) • [www.asisa.es](http://www.asisa.es)

# Cambios en la distribución etaria de los casos de gripe B observados en la Comunidad balear en dos temporadas epidémicas recientes (2012/13 y 2014/15)

*Age-distribution changes in influenza B cases in two recent epidemic seasons (2012/13 and 2014/15) observed in the Balearic Community*

**Jordi Reina<sup>1</sup>, Antonio Iñigo<sup>1</sup>, Francesc Ferrés<sup>2</sup>, Victoria Fernández-Corominas<sup>2</sup>, Joan Vidal<sup>3</sup>, Jaume Giménez<sup>4</sup> y Red Centinela de Vigilancia de la Gripe (RCVG) de Baleares.**

1. Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, 2. Servicio de Urgencias de Pediatría,  
3. Servicio de Urgencias de Adultos, Hospital Universitario Son Espases.  
4. Servicio de Epidemiología. Consellería de Salut de la CAIB.

## Correspondencia

Jordi Reina

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología

Hospital Universitario Son Espases

Carretera de Valldemossa, 79. 07010 - Palma de Mallorca

E-mail: jorge.reina@ssib.es

Recibido: 11 - I - 2016

Aceptado: 26 - II - 2016

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.31.01.11

## Resumen

**Introducción:** La gripe es una enfermedad infecciosa causada por los virus gripales A y B que afecta a la población general. La gripe B parece predominar en la población infantil (<15 años). El objetivo de este estudio es comparar el patrón etario de presentación de los casos de gripe B.

**Métodos:** Se ha realizado un estudio prospectivo comparativo entre la distribución etaria de los casos de gripe B diagnosticados durante las temporadas gripales 2012/13 y 2014/15. La detección viral se realizó mediante una RT-PCR en tiempo real.

**Resultados:** En la temporada 2012/13 se diagnosticaron 290 casos de gripe correspondiendo 204 a gripe B (70.3%), de ellos 38 (18.6%) en la RedC y 166 (81.4%) en el ámbito hospitalario. En la temporada 2014/15 los casos de gripe fueron 618 y de ellos 107 (17.3%) correspondieron a gripe B; la RedC aportó 26 (24.2%) casos y el Hosp 81 (75.8%). La distribución de casos por edad fueron de 128 (62.7%) en menores de 15 años y 76 (37.3%) en mayores de esa edad en la temporada 2012/13 y de 35 casos (32.7%) y 72 casos (67.3%) respectivamente en la temporada 2014/15. El número de casos graves de la temporada 2012/13 fueron de 38, de los cuales 19 (50%) eran <15 años; en la temporada 2014/15 el número de casos graves fue de 59, 6 (10.1%) de los cuales eran gripe B.

**Conclusiones:** En este estudio se confirma que globalmente la gripe B se presenta en los menores de 15 años, aunque debería aceptarse que lo más concreto sería decir en los menores de 50 años. El patrón epidemiológico de la gripe B puede ser variable de modo que en una temporada puede afectar mayoritariamente a la población infantil y en otra a la adulta.

**Palabras clave:** Gripe B, distribución etaria, epidemiología

## Abstract

**Introduction:** Influenza is an infectious disease caused by influenza viruses A and B that affects the general population. Influenza B seems to predominate in children (<15 years). The aim of this study was to compare the age pattern of presentation of cases of influenza B.

**Methods:** We performed a prospective study comparing the age distribution of influenza B cases diagnosed during influenza seasons 2012/13 and 2014/15. Viral detection was performed by RT-PCR in real time.

**Results:** In 2012/13 290 cases of influenza corresponding to influenza B (70.3%), of which 38 (18.6%) in the RedC and 166 (81.4%) in hospitals were diagnosed. In season 2014/15 flu cases were 618 and 107 of them (17.3%) were influenza B; the RedC provided 26 (24.2%) cases and Hosp 81 (75.8%). The distribution of cases by age were 128 (62.7%) in children under 15 years and 76 (37.3%) in older in 2012/13 and 35 cases (32.7%) and 72 cases (67.3%) respectively in the 2014/15 season. The number of severe cases of the 2012/13 season were 38, of which 19 (50%) were <15 years; in the 2014/15 season the number of severe cases was 59, 6 (10.1%) of whom were influenza B.

**Conclusions:** This study confirms that overall influenza B occurs in children under 15 years, although it should be accepted that the most concrete would say in those under 50 years. The epidemiological pattern of influenza B can be variable so that in one season may largely affect children and another on the adults.

**Keywords:** Influenza B, age distribution, epidemiology

## Introducción

La gripe es una enfermedad infecciosa causada por los virus gripales A y B que afecta a la población general de forma epidémica o pandémica. Desde el punto de vista epidemiológico la gripe A produce epidemias cada año (temporada gripal), mientras que la gripe B acostumbra a presentarse cada 2-3 años, además con porcentajes de participación media del 20% (aunque puede oscilar entre el 0-90%)<sup>1,2</sup>.

La gripe A afecta en general a todas las personas en diferentes edades de la vida pero presenta una mayor morbilidad y mortalidad en los extremos de la misma (<4 años y >65 años). La gripe B por el contrario parece afectar preferentemente a la población infantil (<15 años) debido a la falta de inmunidad previa frente a la misma<sup>3-6</sup>.

Sin embargo debe tenerse en cuenta que la epidemiología de la gripe estacional se ve muy influenciada por la edad de la población y las características antigénicas de los virus gripales<sup>7</sup>. Así en general las mayores tasas de notificación se producen en la población infantil, aunque la presentación clínica de la misma varía en función de la edad del paciente. Por debajo de los 4-5 años la inespecificidad clínica del cuadro respiratorio dificulta su caracterización como gripe<sup>8</sup>. En la población adulta y especialmente en los >65 años la gripe se somete a un mayor control y vigilancia activa por los riesgos incrementados en este tipo de población<sup>9-11</sup>.

Debido a que el número de casos de gripe B detectados en dos temporadas distintas recientes ha sido elevado, hemos estudiado la distribución etaria de los mismos y su comparación para comprobar el patrón epidemiológico de la gripe B en función de la edad de los pacientes afectados. También se ha estudiado la distribución etaria en función del origen del paciente infectado.

## Pacientes y métodos

Se ha realizado un estudio prospectivo comparativo entre la distribución etaria de los casos de gripe B diagnosticados durante las temporadas gripales 2012/13 y 2014/15 en las Islas Baleares.

A cada paciente con sospecha clínica de gripe o de infección respiratoria aguda que acudía a urgencias o era hospitalizado se le tomó un frotis faríngeo. A los pacientes procedentes de la red centinela, formada por 25 médicos de familia y 9 pediatras, que cumplían criterios clínicos de gripe también se les tomó un frotis faríngeo<sup>12,13</sup>.

Todas las muestras fueron procesadas, en menos de 24 horas, mediante una técnica de amplificación mo-

lecular tipo RT-PCR comercial que permite la detección simultánea y diferencial de 16 virus respiratorios distintos (Anyplex RV16; Seegen, Corea del Sur).

Los datos clínicos referentes a la edad de los pacientes fueron obtenidos de las hojas de solicitud analítica virológica. Se han considerado como pacientes pediátricos los menores de 15 años. Los casos se han agrupado en función del origen de los pacientes: red centinela (RedC) y ámbito hospitalario (urgencias de pediatría, urgencias de adultos e ingresos de adultos). Los casos graves hospitalizados cumplían los criterios recomendados<sup>12</sup>.

## Resultados

En la temporada 2012/13 se diagnosticaron 290 casos de gripe correspondiendo 204 a gripe B (70.3%), de ellos 38 (18.6%) en la RedC y 166 (81.4%) en el ámbito hospitalario. En la temporada 2014/15 los casos de gripe fueron 618 y de ellos 107 (17.3%) correspondieron a gripe B; la RedC aportó 26 (24.2%) casos y el Hosp 81 (75.8%). La distribución de casos de gripe B por edad fueron de 128 (62.7%) en menores de 15 años y 76 (37.3%) en mayores de esa edad en la temporada 2012/13 y de 35 casos (32.7%) y 72 casos (67.3%) respectivamente en la temporada 2014/15. El número de casos graves de la temporada 2012/13 fueron de 38, de los cuales 19 (50%) eran <15 años; en la temporada 2014/15 el número de casos graves fue de 59, 6 (10.1%) de los cuales eran gripe B.

En las **Tablas I** se expone la distribución etaria de todos los casos de gripe B diagnosticados en la temporada 2014/15 y en la **Tabla II** sólo los diagnosticados en los adultos. Ningún paciente pediátrico requirió de ingreso hospitalario, mientras que si lo precisaron 21 pacientes adultos (19.6% de todos los casos y el 29.2% de los pertenecientes a este grupo etario). Globalmente los mayores de 65 años y el grupo de entre 15-50 años han presentaba el mayor porcentaje de casos (28.9% y 24.3% respectivamente).

**Tabla I:** Distribución etaria de todos los casos de gripe B diagnosticados en la temporada 2014-2015

Edades*	RedC	UrgPed	UrgA	IngAd	Total
0-4	1 (3.8)**	15 (53.5)	0	0	16 (14.9)
5-14	6 (23.1)	13 (46.5)	0	0	19 (17.7)
15-50	15 (57.6)	0	8 (25.0)	3 (14.2)	26 (24.3)
51-65	3 (11.5)	0	8 (25.0)	4 (19.1)	15 (14.1)
>65	1 ( 3.8)	0	16 (50.0)	14 (66.6)	31 (28.9)
	26 (24.3)	28 (26.1)	32 (29.9)	21 (19.6)	107

\*Edades en años; \*\*número de casos (%) sobre total  
RedC= Red Centinela; UrgPed= urgencias de pediatría; UrgA= urgencias de adultos; IngAd= ingresados adultos.

**Tabla II:** Distribución etária de los casos de gripe B en la población adulta diagnosticados en la temporada 2014-2015

Edades*	RedC	UrgA	IngAd	Total
15-50	15 (79.1)**	8 (25.0)	3 (14.2)	26 (36.1)
51-65	3 (15.7)	8 (29.0)	4 (19.1)	15 (20.8)
>65	1 (5.2)	16 (50.0)	14 (66.6)	31 (43.1)
	19 (26.4)	27 (41.5)	21 (29.2)	72

\*Edades en años; \*\*número de casos (%) sobre total  
RedC= Red Centinela; UrgPed= urgencias de pediatría; UrgA= urgencias de adultos; IngAd= ingresados adultos.

**Tabla III:** Comparación en la distribución etária de los casos de gripe B diagnosticados en la temporada 2012/13 y 2014/15

Edades*	2012/13 RedC	2014/15 RedC	2012/13 Hosp	2014/15 Hosp	Total
0-4	1 (2.6)	1 (3.8)	68 (40.9)	15 (18.5)	85 (27.3)
5-14	5 (13.1)	6 (23.1)	54 (32.5)	13 (16.1)	78 (25.1)
15-50	23 (60.5)	15 (57.6)	22 (13.2)	11 (13.5)	71 (22.8)
51-65	8 (21.1)	3 (11.5)	9 (5.4)	12 (14.8)	32 (10.2)
>65	1 (2.6)	1 (3.8)	13 (7.8)	30 (37.0)	45 (14.4)
	38	26	166	81	311

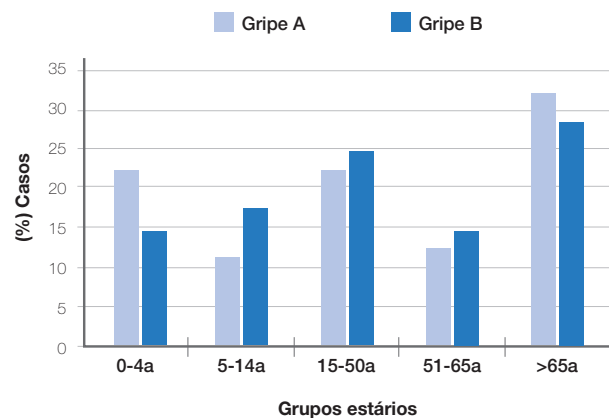
\*Edades en años; \*\*número de casos (%) sobre total  
RedC= Red Centinela; Hosp= Pacientes hospitalarios

La mayoría de los pacientes con gripe B de la RedC (79.1%) pertenecían al grupo de 15-50 años, mientras que los diagnosticados en el ámbito hospitalario predominaban entre los mayores de 65 años (96.6%). También este mismo grupo de edad presentaba el porcentaje más alto de ingreso hospitalario (66.6%) (**Tabla II**).

La comparación entre la distribución etária observada entre las dos temporadas analizadas (**Tabla III**) demuestra que en la RedC no se han producido cambios significativos entre los diferentes grupos de edad. Se confirma al grupo de entre 15-50 años como el predominante en ambas temporadas.

Los cambios más significativos se han producido en los casos diagnosticados en el ámbito hospitalario (**Tabla III**). Destaca el predominio de los casos pediátricos (73.4%) en la temporada 2012/13 frente al predominio de los casos en adultos (65.5%) de la última temporada. Así como el porcentaje de pacientes adultos de >65 años del 37% en la última temporada frente a tan solo el 7.8% de la temporada 2012/13.

En la **Figura 1** se presenta la distribución porcentual de los casos de gripe A y B diagnosticados en la temporada 2014/15. Se observa un predominio global de la gripe B en el segmento de edad comprendido entre los 5-65 años y tan solo una mínima diferencia en los >65 años (32.1% gripe A y 28.4% gripe B).

**Figura 1:** Distribución etária de los casos de gripe A y gripe B diagnosticados en la temporada 2014/15.

## Discusión

A partir de los datos analizados, resulta evidente que se han estudiado dos brotes gripales tipo B totalmente distintos. El primero de ellos (temporada 2012/13) afectó, siguiendo el patrón clásico<sup>3,4,7,14</sup>, a la población infantil menor de 15 años (62.7%). En esa temporada cocircularon dos cepas del linaje Yamagata (80%) (B/Estonia/55669/2011 y B/Wisconsin/1/2010) y una del linaje Victoria (20%) (B/Brisbane/60/2008) y la vacuna contenía la cepa B/Wisconsin/1/2010 (linaje Yamagata), no considerándose que hubiera una significativa diferencia antigénica entre las cepas circulantes y la vacunal, salvo con las cepas del linaje Victoria.

En la última temporada (2014/15) la gripe B ha presentado una menor incidencia de casos que en la 2012/13 (17.3% frente a 70.3%). En esta temporada los mayores de 15 años representaron el 67.3% de todos los casos; es decir afectó preferentemente a la población adulta. Las cepas de gripe B circulantes en esta temporada fueron las pertenecientes al linaje Yamagata (B/Phuket/3073/2013) y no se identificaron diferencias antigénicas con la cepa vacunal (B/Massachusetts/2/2012) del mismo linaje<sup>15</sup>.

Por todo ello no parece que la falta de coincidencia o concordancia antigénica entre las cepas circulantes y las vacunales sean la causa directa de esta diferencia en la distribución etária de los casos de gripe B observados entre ambas temporadas. Sin embargo, Socan et al.<sup>16</sup> han comprobado como los pacientes infectados con el linaje Victoria son significativamente más jóvenes que los infectados por el linaje Yamagata. De este modo el linaje Victoria predominaría en el grupo de 15-34 años tanto en los pacientes comunitarios como ambulatorios. En la población de menor edad (0-4 años) los linajes afectarían por igual (55% frente a 45%).

El predominio de la edad pediátrica en la temporada 2012/13 coincide con los datos comunicados a nivel

europeo y nacional<sup>7,17</sup>. Sin embargo en nuestro estudio, los casos de gripe B comunicados en esa temporada por la RedC predominaron en el grupo de entre 15-50 años (60.5%) y de todos ellos el 84.3% eran mayores de 15 años. Donde se produjo el cambio etáreo fue en los pacientes que acudían a urgencias hospitalarias; en esta situación el 73.4% de los casos de gripe eran <15 años. En estudios previos se ha comprobado que debido a las dificultades para comprobar el cumplimiento de los criterios definitorios de gripe, los pediatras de la RedC sólo toman muestras de pacientes mayores de 4 años<sup>9</sup>. Este hecho podría explicar el mayor número de casos de entre 0-4 observados en urgencias.

Lo que llama la atención en este estudio es la distribución etárea de la temporada 2014/15; tal y como se ha mencionado mostró un predominio claro en la población adulta y especialmente en los mayores de 65 años. Al compararla por el origen de los pacientes, puede observarse como en los procedentes de la RedC no existen diferencias entre los diferentes grupos etáreos entre las dos temporadas. En la última de ellas predominó el grupo de 15-50 años y se incrementó el de los situados entre 5-14 años; todo ello determinó que en esta temporada el 73.1% de los casos de la RedC tuvieran >15 años (84.3% en la temporada 2012/13). Así pues en el ámbito comunitario no pueden apreciarse diferencias en la distribución de los casos de gripe B entre las dos temporadas analizadas. Se confirma con ello que a nivel comunitario el 79.6% (51/64) de todos los casos de gripe B diagnosticados en estas dos temporadas a través de la RedC se presentaron en >15 años. Clásicamente se había comunicado que la gripe B presentaba menor morbilidad porque afectaba preferentemente a la población infantil, frente a la cual carecen de inmunidad previa<sup>2-4,16</sup>.

Al comparar los casos diagnosticados en el ámbito hospitalario se observa una diferencia significativa en los casos de pacientes <15 años. Así en la temporada 2012/13 el 73.4% de los pacientes pertenecían a este grupo etáreo, mientras que en la última temporada tan solo representaron el 34.5%. Por lo tanto resulta evidente, al menos en nuestra Comunidad Autónoma, que en la temporada 2014/15 la gripe B ha afectado preferentemente a la población adulta (65.5%). Además dentro de este grupo, el mayor porcentaje se ha detectado en los >65 años (37%), de los cuales el 66.6% requirieron ingreso hospitalario. En la temporada 2012/13 sólo el 7.8% de los casos eran >65 años, lo cual determina un incremento significativo en este grupo etáreo.

La gripe afecta generalmente a toda la población aunque se concentra preferentemente en las edades extremas de la vida<sup>1,2,7</sup>. Globalmente, entre las dos temporadas analizadas, los casos de gripe B han predominado ligeramente en los <15 años (52.5%) a pesar de que este grupo contiene un menor número de personas susceptibles. Los casos detectados en adultos han supuesto el

47.5%, a pesar del cambio etáreo observado en la última temporada gripal, siendo los >65 años el 14.4% de los afectados y predominando entre los situados entre los 15-50 años (22.8%). De este modo se podría afirmar que la gripe B afecta predominantemente a las personas <50 años (75.2%), estando afectadas en el 24.8% las situadas por encima de esta edad<sup>18</sup>. En el estudio de Harvala et al.<sup>14</sup>, que analiza la distribución por edades de los casos de gripe B desde el año 2000 hasta 2012, se comunica que el 20.1% de los casos se presentan en menores de 5 años y el 41.2% en menores de 15 años (58.8% en adultos). La incidencia de gripe B en los mayores de 65 años es del 10.4%, algo inferior a la nuestra (14.4%), aunque el número de casos analizados en este estudio es mucho mayor al nuestro y además abarca un período de tiempo más prolongado.

El análisis comparativo entre la distribución etárea de los casos de gripe A y gripe B en la temporada 2014/15 refleja un predominio en los pacientes con gripe B en las edades comprendidas entre 5-65 años, con porcentajes ligeramente superiores a la gripe A. Este hecho se ha producido a pesar de la falta de concordancia entre las cepas de gripe A circulantes y las incluidas en la vacuna<sup>15</sup>. En la población de >65 años los porcentajes de gripe B han sido del 28.4% frente al 32.1% de gripe A, confirmando la mayor afectación de este grupo de edad debido a la presencia de patologías de base que incrementan la morbilidad gripal (7,20). Datos algo inferiores han sido comunicados en Escocia, afectando la gripe B al 10.4% de los >65 años frente al 27.8% de la gripe A<sup>14</sup>.

En resumen en este estudio se confirma que globalmente la gripe B predomina en los menores de 15 años, aunque debería aceptarse que lo más concreto sería decir en los menores de 50 años. El patrón epidemiológico de la gripe B puede ser variable de modo que en una temporada puede afectar mayoritariamente a la población infantil y en otra a la adulta. No parece, al menos en nuestro caso, que el cambio de comportamiento pueda atribuirse a la discordancia entre las cepas circulantes y vacunales, pues en ambas circuló preferentemente alguna variedad antigénica del linaje Yamagata.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Wright PF, Neumann G, Kawakami Y. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM (ed.). *Fields Virology* (6th). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, pp.1186-1243.
2. Kidd M. Influenza viruses: update on epidemiology, clinical features, treatment and vaccination. *Curr Opin Pulm Med* 2014; 20:242-6.
3. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Gruber PA. Influenza virus infections in infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:1065-8.
4. Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O. Influenza A and B virus infections in children. *Clin Infect Dis* 2003; 36:299-305.
5. Reina J, Ferrés F, Gutierrez O, Figuerola J, Ruiz de Gopegui E, Balliu P, et al. Evolución de los grupos de edad y edad media de los pacientes pediátricos infectados por los virus gripales A y B durante el período 1995-2005. *Rev.Esp. Pediatr.* 2006; 62:143-9.
6. Antonova EN, Rycroft CE, Ambrose CS, Heikkinen T, Principi N. Burden of paediatric influenza in Western Europe: a systematic review. *BMC Public Health* 2012; 12:968.
7. Beaute J, Zucs P, Korsun N, Bragstad K, Enouf V, Kossyvakis A et al. Age-specific differences in influenza virus type and subtype distribution in the 2012/2013 season in 12 European countries. *Epidemiol Infect* 2015, doi:10.1017/S0950268814003422.
8. Reina J, Gimenez J, Red de Vigilancia de la Gripe de las Islas Baleares. Sintomatología de los pacientes con gripe confirmada diagnosticados en atención primaria a través de la Red Centinela de Vigilancia de la Gripe. *Rev Esp Pediatr* 2015; 71:16-8.
9. Kaji M, Watanabe A, Aizawa H. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2 and B in adult patients. *Respirology* 2003; 8:231-3.
10. Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam PP, Science M, Kuster SP et al. Population risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 2013; 347:f5061.
11. Hayward AC, Frangou EB, Bermingham A, Wang L, Copas A, Edmunds WJ et al. Comparative community burden and severity of seasonal and pandemic influenza: results of the Flu Watch cohort study. *Lancet Respir Med* 2014; 2:445-54.
12. Sistema de Vigilancia de la gripe en España. Guía de procedimientos para la vigilancia de gripe en España. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Julio 2014.
13. Diario Oficial de la Unión Europea. Decisión de la comisión de las Comunidades Europeas de 28/IV/2008 que modifica la Decisión 2002/253/CE por la que se establecen las definiciones de casos para comunicar las enfermedades transmisibles a la red comunitaria, de conformidad con la Decisión nº2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. 1 de Mayo de 2009. L110/58-59.
14. Harvala H, Smith D, Salvatierra K, Gunson R, von Wissmann B, Reynolds A et al. Burden of influenza B virus infections in Scotland in 2012/13 and epidemiological investigations between 2000 and 2012. *Euro Surveill* 2014; 19:pii=20903.
15. Sistema de Vigilancia de la Gripe en España. Informe semanal de vigilancia de la gripe en España. Semana 15/2015. 2015, No-431.
16. Socan M, Prosenc K, Ucakar V, Berginc N. A comparison of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection. *J Clin Virol* 2014; 61:156-60.
17. Eiros JM, Pérez A. Impacto del virus gripal tipo B y divergencia con la cepa B incluida en la vacuna antigripal en España. *Rev Esp Quimioterap* 2015; 28:39-46.
18. Glezen WP, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J. The burden of influenza B: a structured literature review. *Am J Public Health* 2013; 103:e43-51.
19. Hinds AM, Bozat-Emre S, Van Caesele P, Mahmud SM. Comparison of the epidemiology of laboratory-confirmed influenza A and influenza B cases in Manitoba, Canada. *BMC Public Health* 2015; 15:35.
20. Wie SH, So BH, Song JY, Cheong HJ, Seo YB, Choi SH et al. A comparison of the clinical and epidemiological characteristics of adult patients with laboratory-confirmed influenza A or B during the 2011-2012 influenza season in Korea: a multi-center study. *PLoS One*, 2013:e62685.

# Nomograma predictivo de hiperglucemia. Aplicación en población trabajadora

*Hyperglycemia predictive nomogram. Working population application*

**M<sup>a</sup>. Teófila Vicente-Herrero<sup>1</sup>, Cristina Santamaría Navarro<sup>2</sup>,  
Belén García-Mora<sup>2</sup>, Carlos Sánchez Juan<sup>3</sup>**

1. Doctora en Medicina. Servicio Medicina del Trabajo. Grupo Correos. Valencia.

2. Doctora en Matemáticas. Instituto de Matemática Multidisciplinar. Universitat Politècnica de València .

3. Doctor en Medicina. Especialista en Endocrinología y Nutrición. Hospital General. Valencia.

## Correspondencia

Dra. M<sup>a</sup> Teófila Vicente Herrero  
Servicio Medicina del Trabajo - Grupo Correos  
Plaza del Ayuntamiento, 24-2º. 46002 Valencia  
Teléfono: 96 310 27 52 / Fax: 96 394 05 00  
E-mail: mtvh@ono.com / correteo@gmail.com / grupo.gimt@gmail.com

Recibido: 4 – I – 2016

Aceptado: 2 – III – 2016

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.31.01.16

## Resumen

**Antecedentes:** El incremento de pacientes diabéticos infradiagnosticados y sin antecedentes familiares, recomienda el uso de modelos predictivos para una precoz prevención y detección del riesgo.

**Objetivos:** identificar gráficamente mediante nomograma, variables que pueden influir en presentar valores de glucemia basal  $\geq 100$  mg/dl como factor de riesgo de diabetes.

**Material y método:** En 6.345 trabajadores, de ambos sexos (56,8% mujeres, 43,2% hombres) y 41 años de edad media se analiza la relación de variables independientes, con tener una glucemia basal  $\geq 100$  mg/dl o  $<100$  mg/dl (variable dependiente o respuesta) y, a partir de modelo multivariante se desarrolla uno de regresión para diseñar un nomograma que relaciona estas variables.

**Resultados:** puntuaciones entre rangos de 0 a 11 (mejor/peor pronóstico) definen los grupos de riesgo: bajo (0-2), medio (3-8) o alto ( $> 9$ ), y la probabilidad asignada a cada grupo de tener un nivel glucémico  $\geq 100$  mg/dl

Se estima la probabilidad de que las cifras altas de glucemia evolucionen hacia diabetes tipo 2: 35.1% para personas de riesgo alto, 1.6% para riesgo bajo y 5.2% y 13.6% en los grupos medios de riesgo.

**Conclusiones:** Los resultados podrían facilitar actuaciones preventivas precoces desde las empresas y de utilidad en Salud Pública.

**Palabras clave:** Nomograma, Regresión logística multivariante, algoritmo de riesgo, Prevención de Diabetes, Salud Pública, Salud Laboral

## Abstract

**Background:** The growing number of people with undiagnosed diabetes and no previous family history approaches the use of predictive models for prevention and early detection of risk.

**Objectives:** to identify graphically, using a nomograph, the variables that can influence a person has blood glucose basal level  $\geq 100$  mg/dl as a risk factor for diabetes.

**Patients and methods:** We analyse in 6.345 workers of both sexes (56.8% female, 43.2% male), mean age 41 years, the relationship between independent variables and the basal levels of blood glucose  $\geq 100$  mg/dl or  $<100$  mg/dl. A regression model is done to design a nomogram that relates these variables.

**Results:** scores ranging from 0-11 (better / worse prognosis) classified in four risk groups: low (0-2), medium (3-8) or high ( $> 9$ ). The probability of having a glycemic levels  $\geq 100$  mg/dl is assigned to each group. The nomograph predicts the probability of evolution to high blood glucose levels and potential diabetes type 2: 35.1% for the high risk group, 1.6% for the low risk group and 5.2 %-13.6% for the media risk groups.

**Conclusions:** this result could provide early preventive actions from the companies, being useful in Public Health.

**Keywords:** Nomogram, Multivariate logistic regression, risk algorithm, Diabetes prevention, Public Health, Occupational Health



## Introducción

La Diabetes es considerada a nivel mundial como la gran epidemia del siglo XXI, una enfermedad crónica con un rápido incremento en su incidencia y prevalencia en los últimos años. Se estima que actualmente existen 382 millones de personas diabéticas y que siguiendo los patrones demográficos actuales, más de 592 millones de personas estarán afectadas de diabetes en la próxima generación con un creciente número de muertes prematuras en menores de 60 años<sup>1</sup>.

Entre los factores de riesgo de diabetes se encuentra el sobrepeso, cuyo incremento con la edad, especialmente en mujeres, se asocia con cifras elevadas de glucemia basal y un alto riesgo de desarrollo de patologías de riesgo cardiovascular tanto en pacientes diabéticos ya conocidos como en otros no diagnosticados todavía<sup>2</sup>.

Entre los aspectos preventivos a desarrollar para hacer frente a esta pandemia, destaca la importancia de realizar actuaciones precoces para control y disminución del riesgo cardiovascular, tanto en lo relacionado con cifras de glucemia  $\geq 100$  mg/dl como con variables vinculadas a la obesidad, consideradas conjuntamente con otros factores de riesgo cardiovascular (RCV).

Recientes estudios llevados a cabo en ámbito laboral ponen de manifiesto que, a medida que aumentan el valor de estas variables relacionadas con RCV (peso, Índice de Masa Corporal-IMC- perímetro de cintura grasa visceral, grasa corporal, metabolismo basal, edad, Presión Arterial-PA-, nivel de HbA1c, el colesterol total, triglicéridos, edad cardíaca, años perdidos y Framingham real y teórico), lo hace la probabilidad de pertenecer al grupo de glucemia  $\geq 100$  mg/dl, riesgo que está incrementado en varones. Se observa también que las personas con diagnósticos previos de enfermedades asociadas al RCV, pese a estar ya sometidas a control farmacológico, tienen mayor probabilidad de pertenecer al grupo de personas con  $\geq 100$  mg/dl de glucemia<sup>3</sup>.

Del análisis de los datos epidemiológicos se concluye que resulta importante identificar los factores que pueden ser determinantes en la aparición de cifras consideradas de riesgo en diabetes, así como disponer de una herramienta clínica que permita aprovechar esta información para optimizar el tratamiento y seguimiento de los pacientes. Si el paciente no alcanza las cifras consideradas de riesgo, se podrá actuar en prevención a partir de este factor pronóstico.

Hasta el momento no se cuenta con una herramienta sencilla que permita una fácil interpretación de la relación de determinados factores clínicos y analíticos con valores elevados de glucemia predisponentes al desarrollo de diabetes. Una herramienta de estas características es el nomograma, nacido a finales del siglo XIX con el trabajo de Maurice D'Ocagne<sup>4</sup> como una forma gráfica de re-

presentar relaciones entre cantidades. Los nomogramas proporcionan una excelente organización gráfica de todas las variables de un modelo y permiten al usuario obtener manualmente los valores que se infieren a partir de los predictores<sup>5</sup>. Se parte de un modelo de regresión que asigna una puntuación a cada factor predictor de un individuo, en base a la puntuación total obtenida, permite calcular la probabilidad del riesgo o de la recaída. Es muy amplio el número de nomogramas desarrollados para aplicaciones estadísticas<sup>6,7</sup>. En medicina se están aplicando actualmente en la predicción de recaídas en cáncer de próstata, de riñón<sup>8,9</sup> en vejiga<sup>10</sup> y en tabaquismo<sup>11</sup>, así como para la detección de diabetes infradiagnosticadas<sup>12</sup> o el estudio DESIR de 2008 en base a la valoración de polimorfismos genéticos y a la relación entre obesidad y diabetes<sup>13</sup>.

La utilización de modelos predictivos del riesgo en diabetes ha sido creciente en los últimos años con base, en la mayor parte de los estudios a variables como el peso, la edad, el sexo, el perímetro de cintura y la historia familiar previa de diabetes<sup>14</sup>. Las revisiones sistemáticas realizadas evidencian la importancia de actuaciones preventivas mediante el uso de modelos predictivos<sup>15</sup> y de su utilidad en Salud Pública<sup>16</sup>.

Es objetivo de este trabajo unificar toda la información en cuanto a parámetros de riesgo en diabetes en una herramienta sencilla y gráfica, que permita al médico decidir el protocolo de seguimiento y tratamiento más adecuado en relación con la situación de la enfermedad del paciente y actuar como herramienta predictiva y especialmente en prevención primaria.

## Material y métodos

Se realiza la recogida de datos en un colectivo de 6345 trabajadores del área mediterránea española y de diversas empresas de servicios del sector público desde enero a diciembre de 2013, durante los reconocimientos periódicos de vigilancia de la salud.

Cumpliendo la legislación vigente, se informó de la realización del estudio a los Comités de Seguridad y Salud de las empresas participantes y se registró por escrito el consentimiento informado de las personas que se incluyeron en el mismo.

Se incluyen como variables del estudio: edad, sexo, presión arterial, IMC, Perímetro de cintura, parámetros lipídicos, edad del corazón y riesgo cardiovascular.

Se considera actividad física cuando se realiza habitualmente al menos 30 minutos al día o 4 horas semanales tanto en el trabajo como en el tiempo libre.

La presión arterial se determinó empleando un esfigmomanómetro automático OMRON M3 calibrado; tras un periodo de reposo de 10 minutos en decúbito

supino, con tres mediciones realizadas a intervalos de 1 minuto de separación entre ellas, calculándose la media de las tres mediciones. Se consideró HTA cuando los valores eran iguales o superiores a 140/90 mmHg.

Para calcular la edad del corazón se calculó mediante la herramienta denominada "Heart age calculator", disponible en la página web: [www.heartage.me](http://www.heartage.me). El peso de cada uno de los parámetros analizados sobre la edad del corazón es similar al que tienen esos mismos factores en la determinación del riesgo cardiovascular según el modelo de Framingham. Los parámetros necesarios para el cálculo de la edad del corazón son los siguientes: edad, sexo, altura (en centímetros), peso (en kilogramos), perímetro de cintura (en centímetros), antecedentes de enfermedad cardiovascular de madre o padre y edad que tenían cuando la sufrieron por primera vez, presencia o no de diabetes, consumo de tabaco (si no se fuma en la actualidad también se pregunta si se ha abandonado el consumo en el último año), valores de colesterol total y HDL colesterol y finalmente valores de presión sistólica y si se está actualmente en tratamiento antihipertensivo. Al restar del valor obtenido de la herramienta la edad real obtenemos el número de años que la persona ha "ganado o perdido". Una limitación de esta herramienta es que se obtienen valores comprendidos entre más-menos 20 años de edad, es decir la persona no podrá tener 20 años más o menos de su edad biológica, ni tampoco menos de 18 años ni más de 80 años de edad del corazón.

El ejercicio físico se determinó mediante entrevista clínica estructurada y realizada durante el reconocimiento médico. De acuerdo con el American College of Sport Medicine y la American Heart Association se considera una actividad física cardiosaludable cuando la persona realiza habitualmente 30 minutos de actividad física moderada al menos 5 días a la semana o 20 minutos de actividad vigorosa tres días a la semana<sup>17</sup>.

Se realiza en primer lugar el estudio descriptivo de los datos, para conocer los rasgos básicos de la población estudiada. Se han excluido para el cálculo del normograma 217 pacientes con diagnóstico de diabetes previa y 255 de los que no se disponía de cifras de hemoglobina glicosilada. Con el resto de la muestra (5,873 pacientes) se detallan, mediante un análisis univariante, las características medidas en la población, utilizando tablas de frecuencias y gráficos en el caso de variables cualitativas y medias en el caso de variables cuantitativas. Este descriptivo debe servir además para identificar posibles errores de sesgo, que deben ser corregidos para las fases posteriores del estudio.

En un segundo paso, mediante estudio estadístico bivariable, se lleva a cabo un análisis de dependencias para determinar la posible relación de dependencia entre: tener un nivel de glucemia (categorizada en los niveles  $<100$  o  $\geq 100$  mg/dl) y cada una de las demás

variables recogidas, como una primera aproximación en la identificación de "factores de riesgo" o relaciones causales entre las variables recogidas y el nivel de glucemia. Cuando la variable sea continua se hará la comparación de medias y se utilizará la prueba t de Student-Fisher, aplicándose la prueba no paramétrica correspondiente (test U de Mann-Whitney) en caso de no cumplirse el principio de normalidad. Cuando la variable sea cualitativa, se realizará la comparación de proporciones y se utilizará la prueba chi-cuadrado de Pearson. En todos los cálculos se acepta como nivel de significación un valor de  $p$  inferior a 0.05.

Finalmente, en una tercera fase se realiza estudio multivariante para identificar las variables que están vinculadas mediante una relación causal con un nivel de glucemia de riesgo, (considerando como tal un nivel de glucemia basal  $\geq 100$  mg/dl) esto es, los factores predictores de diabetes (de pertenecer al grupo de nivel de glucemia  $\geq 100$  mg/dl). Para ello, se ha analizado la relación de cada una de las variables independientes (las características recogidas en cada una de las preguntas) en relación con la variable dependiente o respuesta (nivel de glucemia basal  $\geq 100$  mg/dl  $>$  ó  $<$  100 mg/dl). Entre las variables independientes se han analizado: edad, sexo, actividad física relacionada con el puesto de trabajo, presión arterial, antecedentes diabetes, peso, talla, IMC, circunferencia de cintura, colesterol, triglicéridos, tabaco, edad cardiaca (EC), años perdidos de EC, RCV medido con escala Framingham real y teórico. Se entiende que son características prevalentes y preexistentes en los sujetos (se han observado los sujetos en el tiempo, lo que garantiza que estas variables están presentes antes que la variable respuesta para considerarlas responsables, lo que permitirá de manera más adecuada realizar este estudio).

La relación entre las variables independientes (y posibles factores de riesgo) y la variable dependiente (o variable respuesta: nivel de glucemia) se ha estudiado mediante regresión logística univariante en un primer paso, determinando la *odds ratio* con los intervalos de confianza al 95%. Posteriormente se ha utilizado la regresión logística multivariante para establecer la relación conjunta entre las variables predictoras y la probabilidad de sufrir diabetes (utilizando el nivel de glucemia). En el estudio multivariante se utilizan las variables que resultaron significativas en el estudio univariante, a las que se asignan unas puntuaciones que permitirán incluir a las personas en el correspondiente grupo de riesgo. Estos grupos de riesgo establecen la probabilidad asignada a cada uno de tener un nivel glucémico  $\geq 100$  mg/dl. La puntuación total que puede obtener una persona oscila en el rango que va desde 0 (mejor pronóstico) hasta 11 (peor pronóstico). Se considera nivel bajo de probabilidad de tener un nivel glucémico  $\geq 100$  mg/dl si se obtienen de 0 a 2 puntos; un nivel medio-bajo si se obtienen de 3 a 5 puntos; un nivel medio-alto si se obtienen entre 6 y 8 puntos; y un nivel alto a partir de 9 puntos.

Se concreta esta información en una herramienta sencilla y gráfica, que permite clasificar a los pacientes en grupos de riesgo asignando a cada uno una puntuación que se obtiene a partir de las características medidas. El *nomograma* mediante la puntuación refleja la contribución conjunta de todos los factores pronóstico del individuo. Dicha puntuación se convierte en una medida clínicamente interpretable.

Para leer el nomograma se debe dibujar una línea vertical desde cada marca que indica el valor del predictor hasta la línea superior (*Points*) de los puntos, se han de calcular los puntos totales correspondientes y localizarlos

en el eje de los puntos totales (*Total Points*). Finalmente se dibuja una línea vertical hacia abajo para obtener la probabilidad de tener un nivel glucémico  $\geq 100$  mg/dl.

## Resultados

El descriptivo de la muestra se describe en la **Tabla I** categorizando las cifras de glucemia en:  $<100$  mg/dl (89%) y  $\geq 100$  mg/dl (11%).

Los resultados del estudio bivalente se muestran en la **Tabla II** y muestran que: son más jóvenes las personas del grupo de glucemia  $< 100$ ; que existe asociación significativamente no nula entre el nivel de glucemia y el sexo, que no tienen el mismo comportamiento los niveles máximo y mínimo de PA en cada grupo de Glucemia; que tener antecedentes de diabetes familiares es un factor de riesgo significativo de tener Glucemia  $\geq 100$  mg/dl; que los valores de IMC son mayores en el grupo de glucemia  $\geq 100$  mg/dl; que existe diferencia significativa en la circunferencia de cintura, siendo mayor en el grupo con glucemia  $\geq 100$  mg/dl; que existen diferencias significativas en los valores lipídicos, siendo superiores en las personas con glucemia  $\geq 100$  mg/dl, si bien el colesterol HDL muestra niveles inferiores de media para este grupo; en los valores de edad cardiaca y años perdidos, ambos son mayores en el grupo de glucemia  $\geq 100$  mg/dl; se observan diferencias significativas en los niveles de Framingham real y teórico entre ambos grupos.

Los resultados del Multivariante se muestran en la **Tabla III**. La relación entre las variables independientes (y posibles factores de riesgo) y la variable dependiente (o variable respuesta: nivel de glucemia) permite establecer la relación conjunta entre las variables predictoras y la probabilidad de sufrir diabetes (utilizando el nivel de glucemia de riesgo  $\geq 100$  mg/dl). Se observa que las

**Tabla I:** Características de la muestra.

Variables Cuantitativas	n	media	dt
Edad	6345	41,2	10,1
PA sistólica (mmHg)	6345	121,3	17,4
PA diastólica (mmHg)	6345	76,1	11,4
Índice de Masa Corporal	6345	25,0	5,9
Perímetro cintura (cm)	6345	86,5	13,7
Colesterol Total (mg/dl)	6345	199,1	36,4
Colesterol LDL (mg/dl)	6345	126,1	35,0
Colesterol HDL (mg/dl)	6345	53,9	13,3
Triglicéridos (mg/dl)	6345	101,6	69,0
Años perdidos edad corazón	6345	2,5	9,3
Framingham real	4565	2,8	2,2
Framingham teórico	4565	1,9	0,6
Variables cualitativas	n	%	
Antecedentes familiares diabetes no	3908	83,1	
Antecedentes familiares diabetes si	2437	51,9	
Hombre	2741	43,2	
Mujer	3604	56,8	
Diabetes Diagnosticada: no	6128	96,6	
Diabetes Diagnosticada: si	217	3,4	
Glucemia $<100$ mg/dl	5645	96,1	
Glucemia $\geq 100$ mg/dl	700	11,9	
No Fumador	3695	74,2%	
Ex-Fumador	371	7,5%	
Fumador	2279	45,8%	

**Tabla II:** Valores de los diferentes parámetros según nivel de glucemia.

Variables cuantitativas	Glucemia $< 100$ (n=5225)		Glucemia $\geq 100$ (n=648)		p
	media	dt	media	dt	
Edad	40,6	10,0	47,9	8,8	$<0.0001$
PA sistólica (mmHg)	121,0	16,5	133,7	19,4	$<0.0001$
PA diastólica (mmHg)	75,8	11,1	82,3	13,0	$<0.0001$
Índice masa corporal	24,6	5,8	27,9	6,3	$<0.0001$
Perímetro cintura (cm)	86,4	12,9	96,7	12,9	$<0.0001$
Colesterol (mg/dl)	197,8	36,4	208,6	39,7	$<0.0001$
c-LDL (mg/dl)	124,5	34,7	131,9	37,7	$<0.0001$
c-HDL (mg/dl)	54,5	13,4	47,1	12,1	$<0.0001$
Triglicéridos (mg/dl)	94,6	57,1	150,9	117,5	$<0.0001$
Años perdidos edad corazón	1,9	8,9	10,8	9,2	$<0.0001$
Framingham real (*)	2,5	1,9	4,5	3,0	$<0.0001$
Framingham teórico (*)	1,9	0,6	2,2	0,6	$<0.0001$
Variables Cualitativas	n	%	n	%	p
Sexo: hombre	2228	83,9	427	16,1	$<0.0001$
Sexo: mujer	2997	93,1	221	6,9	$<0.0001$

(\*) El número de personas en esta categoría con glucemia  $<100$ mg/dl es de 3702 y con glucemia  $\geq 100$ mg/dl es de 593. Framingham se calcula a partir de 35 años, por lo tanto los trabajadores menores de esa edad se pierden en el cálculo.

Tabla III: Regresión Logística univariante y múltiple.

Regresión logística univariante							
Variable	Coef	Err.Est	Wald	p	Odds Ratio	O.R inf.95%	O.R sup.95%
Edad	0.080	0.005	274.728	0.000	1.083	1.073	1.093
Sexo (ref. Hombre)	-0.955	0.087	119.262	0.000	0.385	0.324	0.457
Actividad física asociada al puesto de trabajo (ref. Baja Act. Fis.)							
Intermedia Act. Fis.	-0.063	0.095	0.440	0.507	0.939	0.779	1.132
Alta Actividad Fis.	-0.298	0.110	7.426	0.006	0.742	0.599	0.920
Actividad física extralaboral (ref. Baja/Interm Act. Fis.)							
Alta Actividad Fis.	-0.272	0.102	7.076	0.008	0.762	0.623	0.931
PA Min.	0.045	0.003	170.798	0.000	1.046	1.039	1.053
PA Máx.	0.037	0.002	272.034	0.000	1.037	1.033	1.042
Antecedentes diabetes (ref. No)							
Sí	0.437	0.087	25.274	0.000	1.548	1.305	1.836
Peso	0.039	0.003	236.006	0.000	1.040	1.035	1.045
Talla	0.018	0.005	15.645	0.000	1.018	1.009	1.028
IMC	0.137	0.008	268.228	0.000	1.147	1.129	1.166
Cintura	0.056	0.003	308.243	0.000	1.058	1.051	1.065
Colesterol total	0.008	0.001	49.056	0.000	1.008	1.005	1.010
Colesterol LDL	0.006	0.001	25.399	0.000	1.006	1.004	1.008
Colesterol HDL	-0.050	0.004	169.611	0.000	0.951	0.944	0.959
Triglicéridos	0.008	0.001	247.508	0.000	1.008	1.007	1.010
Tabaco (ref. No fuma)							
Exfumador	-0.329	0.221	2.218	0.136	0.719	0.466	1.110
Fumador	-0.089	0.100	0.792	0.373	0.915	0.466	1.110
Edad cardiaca	0.067	0.003	489.512	0.000	1.069	1.063	1.076
Años perdidos	0.103	0.005	445.925	0.000	1.109	1.098	1.119
Fram. Real	0.324	0.019	293.746	0.000	1.383	1.332	1.435
Fram. Teórico	0.797	0.071	124.938	0.000	2.220	1.930	2.553
Regresión logística múltiple							
Variable	Coef	Err.Est	Chi2	p	Odds Ratio	O.R inf.95%	O.R sup.95%
Edad	0.048	0.005	78.655	0.000	1.049	1.038	1.061
IMC	0.041	0.016	6.871	0.009	1.042	1.011	1.075
Cintura	0.004	0.001	39.378	0.000	1.004	1.002	1.005
Triglicéridos	0.017	0.006	8.050	0.005	1.017	1.005	1.029
Años perdidos							
Edad del corazón	0.057	0.006	97.920	0.000	1.058	1.046	1.070
Constante	-7.676	0.405	358.748	0.000	0.000		

variables edad, presión arterial máxima y mínima, peso, talla, IMC, circunferencia de cintura, metabolismo basal, colesterol total y LDL, triglicéridos, la edad cardiaca, años perdidos, Framingham real y teórico presentan coeficientes estimados positivos (Odds superior a 1) y que a medida que aumentan (en concreto, por cada unidad que aumente su valor) se incrementa la probabilidad de pertenecer al grupo de glucemia  $\geq 100$  mg/dl. A medida que aumenta el nivel de colesterol HDL, se reduce el riesgo de superar el nivel de glucemia de 100. Respecto al sexo, las mujeres presentan menor peligro de tener niveles altos de glucemia que los hombres (el riesgo se reduce aproximadamente un tercio en las mujeres). Se observa también que las personas con alta actividad física relacionada con el puesto de trabajo reducen el riesgo de pertenecer al grupo de glucemia  $\geq 100$  mg/dl. Las personas con antecedentes familiares de diabetes también presentan un riesgo incrementado de pertenecer a este grupo de glucemia.

El modelo, mediante regresión logística, clasifica el pronóstico en un 89.4% de los casos (Tabla IV).

La **Tabla IV** permite ver que, una vez asignadas las puntuaciones a las variables incluidas en el modelo y, definidas las probabilidades de tener unas cifras de glucemia  $\geq 100$  mg/dl se concluye que, cuando se pertenece al grupo de riesgo Alto, las posibilidades de pertenecer al grupo glucemia  $\geq 100$  mg/dl son del 35.1%, en los de Riesgo Bajo las probabilidades son del 1.6% y en los grupos medios entre un 5.2% y un 13.6% respectivamente.

La **figura 1** muestra la representación gráfica y la puntuación conjunta de todos los factores pronósticos para su interpretación clínico-preventiva que se puede apreciar mejor con un ejemplo práctico:

Si partimos de un individuo de 40 años (2 puntos), con un IMC superior a 25 (1 punto), con valor de cintura 90 (1 pun-

**Tabla IV:** Clasificación del Pronosticado y Puntuación del Riesgo.

Clasificación del Pronosticado*				
Observado		Pronosticado		
		Glucemia menor o mayor/igual a 100		Porcentaje correcto
		Glucemia<100	Glucemia≥ 100	
Glucemia menor o mayor/igual a 100	Glucemia<100 Glucemia≥ 100	5192 590	32 57	99,40 8,80
Porcentaje global				89,40
a. El valor de corte es ,500				
Puntuación de Riesgo Estimado				
Variables		Puntuación		
Edad		≤ 35		0
		36-50		2
		> 50		3
IMC		≤ 25		0
		> 25		1
Triglicéridos		≤ 150		0
		150-200		1
		>200		2
Perímetro de Cintura		≤ 80		0
		80.01-95		1
		> 95		2
Años perdidos (edad del corazón)		≤ 5 años		0
		Entre -5 y 5 años		2
		> 5 años		3
<b>Riesgo Bajo (0-2 puntos)</b>	<b>Riesgo Medio-Bajo (3-5 puntos)</b>	<b>Riesgo Medio-Alto (6-8 puntos)</b>	<b>Riesgo Alto (9-11 puntos)</b>	
1.6%	5.2%	13.6%	35.1%	

\*Este modelo clasifica un 89.4% de los casos correctamente

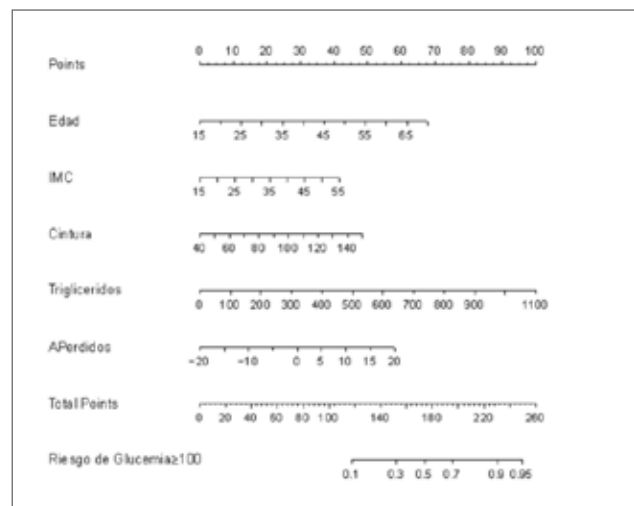
to), nivel de triglicéridos 210 mg/dl (2 puntos) y valor en la variable años perdidos 2 (2 puntos). El total de los puntos de este individuo es de 8 puntos, por lo que se encuentra dentro del grupo de "Riesgo Medio-Alto". Su probabilidad de estar en el grupo de glucemia ≥ 100 mg/dl será del 13,6%.

## Discusión

La utilización de nomogramas en Medicina es una práctica de uso cada vez más habitual, especialmente en el último quinquenio. Un nomograma es una herramienta matemática que permite representar gráficamente modelos de regresión multivariante que recogen información de diversos factores pronósticos. Es decir, se trata de relacionar los diversos factores pronósticos en un sistema gráfico para una interpretación única. La utilización de este instrumento podría suponer una serie de ventajas para la práctica clínica y, en el caso de la Medicina del Trabajo en actividades preventivas y de Promoción de la salud. Proporciona al facultativo una mayor información respecto al estado y expectativas de desarrollo de la enfermedad o proceso en cada paciente. Ello permitiría disponer de más información de cara a planificar

el tratamiento, control y/o seguimiento, con lo que redundaría en una mejor utilización de recursos: disminuir el número de consultas no necesarias, priorizar y prestar mayor atención y medios a los casos que lo requieran y rentabilizar mejor el tiempo y el gasto clínico-sanitario.

**Figura 1:** Nomograma.



El uso del nomograma ya ha sido descrito, como se ha comentado con anterioridad en gran cantidad de áreas médicas como seguimiento del cáncer de próstata, de riñón, de vejiga, en tabaquismo y en ginecología para valorar las dosis hormonales más adecuadas en patologías como el ovario poliquístico<sup>18</sup>, o la edad biológica/cronológica en mujeres infértiles o subfértiles<sup>19,20</sup>. En pediatría se ha usado en neumología pediátrica para validar el uso de fonoespirometría en niños asmáticos en periodo de exacerbación de sus síntomas<sup>21</sup>, o en periodo fetal para establecer referencias entre las semanas <sup>20-37</sup> de gestación<sup>22</sup>. También se ha usado en cirugía oftalmológica en técnicas específicas como la recesión rectolateral en procesos de exotropía<sup>23</sup> y en oncología urológica para predecir la toxicidad urinaria tardía después de aplicar radioterapia, al objeto de apoyar en la toma de decisiones en el tratamiento a aplicar<sup>24</sup>. En cardiología para evaluar el riesgo de muerte en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica<sup>25</sup>.

En el área médica que aquí tratamos, la diabetes, también se han usado nomogramas en algunos aspectos terapéuticos como por ejemplo, para valorar la efectividad de los inhibidores de la DPP-4 en la reducción de la HbA1c absoluta y sobre la glucosa en ayunas, y que apoyan la varianza observada entre los distintos fármacos de este grupo tras realizar una revisión de metaanálisis en ensayos clínicos randomizados y controlados en pacientes con diabetes tipo 2. También se han utilizado para estimar la proporción de pacientes objetivo para cada clase de fármaco no insulínico teniendo como referencia la HbA1c en cifras de < 7 % y en pacientes con diabetes tipo 2 y, como en el caso anterior, en una revisión amplia de ensayos clínicos randomizados<sup>27</sup>.

Desde un punto de vista clínico-preventivo y, en una línea de trabajo similar a la referida en nuestro trabajo, algunos autores han utilizado nomogramas como herramientas de utilidad para predecir el riesgo de Diabetes Mellitus en población general asintomática, utilizando como referencia algoritmos de riesgo basados/no basados en el laboratorio<sup>28</sup>. En nuestro caso para la aplicación del nomograma se incorporan variables de riesgo previamente seleccionadas en el estudio estadístico bivariable y multivariable que aportan una mayor sensibilidad al re-

sultado y que incluyen, junto con valores de laboratorio, aspectos de riesgo cardiovascular y sociodemográficos de especial utilidad en medicina del trabajo y extrapolables a salud pública en las especialidades implicadas.

Una de las herramientas predictivas de riesgo en relación a diabetes más conocidas es el FINDRISC, destacando entre sus ventajas el ser un método no invasivo que permite el diagnóstico de prediabetes o diabetes no detectadas<sup>29</sup>. Algunos de los estudios utilizándola han sido específicamente en ámbito laboral, coincidiendo como el que aquí presentamos en la detección precoz del riesgo y en la actuación preventiva en diabetes no diagnosticadas. Algunos autores inciden en la especial utilidad de aplicación de estas herramientas predictivas en salud laboral partiendo de la evidencia del considerable número de trabajadores con riesgo de diabetes tipo 2 detectados<sup>30</sup>.

Destacar como fortaleza de este trabajo su elevado tamaño muestral y su especificidad en ámbito laboral incluyendo variables concretas del mundo del trabajo. Como limitaciones fundamentales, el hecho de que la herramienta no ha sido validada para población diferente a la laboral y al hecho de no tener recogidos los tratamientos específicos de las personas incluidas con patologías concretas como presión arterial elevada o dislipemias y que pudieran alterar los resultados obtenidos.

La visión preventiva de la Medicina del Trabajo y el concepto de colaboración con Salud Pública que recoge la Salud Laboral contempla aspectos muy específicos del mundo del trabajo como el de trabajador especialmente sensible en diabetes<sup>31</sup>, incapacidad/discapacidad en el trabajador diabético<sup>32</sup>, accidente de trabajo y diabetes<sup>33</sup>, riesgos laborales y terapias en diabetes<sup>34</sup>, en ocasiones con repercusión médico-legal<sup>35</sup> y nos anima a aportar esta herramienta matemática como modelo sencillo en su utilización en aras de optimizar recursos mediante una detección precoz de pacientes no diagnosticados o no debidamente controlados y que podrían de esta forma ser objetivo de actuación precoz antes del desarrollo de la enfermedad y sus posteriores complicaciones con la consiguiente repercusión sanitaria y laboral y en costes directos e indirectos para la sociedad<sup>36</sup>.

## Bibliografía

- Han Cho N, Whiting D, Guariguata L, Aschner Montoya P, Forouhi N, Hambleton I et al. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 6<sup>a</sup> ed. Consultado el 15 de mayo de 2015. [Disponible en: [http://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Atlas\\_Full\\_0.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf)].
- Vicente-Herrero MT, Terradillos-García MJ, Capdevila-García L, Ramírez-Iñiguez de la Torre, López González AA. Riesgo cardiovascular en la población laboral. *Rev Mex Cardiol* 2014; 25 (2): 73-81.
- Vicente-Herrero MT, Terradillos-García MJ, Capdevila-García L, Ramírez-Iñiguez de la Torre, López-González AA. Parámetros de Obesidad y Riesgo Cardiovascular en Población Laboral Española. *Revista Mexicana de Endocrinología, Metabolismo & Nutrición*. 2014;1:38-49.
- D'Ocagne M. *Traité de nomographie: Théorie des abaques, applications pratiques*. Paris: Gauthier-Villars, 1899.
- Harrell FE. *Regression Modeling Strategies with Applications to Linear Models, Logistic Regression and Survival Analysis*. New York: Springer; 2002.
- Banks J. Nomograms. In S. Kotz and N.L. Johnson, editors. *Encyclopedia of Statistical Sciences* (6). New York: Wiley; 1985.
- Hankins TL. Blood, dirt, and nomograms. *Chance* 2000; 13:26-37.
- Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J*

Clin Oncol. 1999;17:1499-507.

9. Kattan MW, Shariat SF, Andrews B, Zhu K, Canto E, Matsumoto K, et al. The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor Beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3573-9.
10. Santamaría C. Modelización matemática de los factores de riesgo en el carcinoma vesical superficial. Nomogramas de predicción de recaída para el seguimiento individualizado de los pacientes. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, septiembre 2006.
11. Peris-Cardells R, García-Mora MB, Santamaría-Navarro C, Rubio-Navarro G, Paniagua-Moliner, A. Nomograma predictivo de recaída en el tratamiento del tabaquismo. Aplicación en intervención mínima. *Prevención del Tabaquismo*. 2008;10(1):6-12.
12. Zhou X, Qiao Q, Ji L, Ning F, Yang W, Weng J, Shan Z, Tian H, Ji Q, Lin L, Li Q, Xiao J, Gao W, Pang Z, Sun J. Nonlaboratory-based risk assessment algorithm for undiagnosed type 2 diabetes developed on a nation-wide diabetes survey. *Diabetes Care*. 2013;36(12):3944-52.
13. Balkau B, Lange C, Fezeu L, Tichet J, de Lauzon-Guillain B, Czernichow S, Fumeron F, Froguel P, Vaxillaire M, Cauchi S, Ducimetière P, Eschwège E. Predicting diabetes: clinical, biological, and genetic approaches: data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care*. 2008;31(10):2056-61.
14. Gao WG, Dong YH, Pang ZC, Nan HR, Wang SJ, Ren J, Zhang L, Tuomilehto J, Qiao Q. A simple Chinese risk score for undiagnosed diabetes. *Diabet Med*. 2010;27(3):274-81.
15. Buijsse B, Simmons RK, Griffin SJ, Schulze MB. Risk assessment tools for identifying individuals at risk of developing type 2 diabetes. *Epidemiol Rev*. 2011;33:46-62.
16. Noble D, Mathur R, Dent T, Meads C, Greenhalgh T. Risk models and scores for type 2 diabetes: systematic review. *BMJ* 2011;343:d7163.
17. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39:1423-34
18. Wiser A, Shalom Paz E, Hyman JH, Sokal Arnon T, Bantan N, Holzer H et al. Age-related nomogram for antral follicle count in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(4):414-8.
19. Wiweko B, Prawesti DM, Hestiantoro A, Sumapraja K, Natadisastira M, Baziad A. Chronological age vs biological age: an age-related nomogram for antral follicle count, FSH and anti-Mullerian hormone. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(12):1563-7.
20. Naasan MN, Harrity C, Pentony L, Mocanu E. Anti-Mullerian hormone nomogram in an Irish subfertile population. *Ir J Med Sci*. 2015;184(1):213-8.
21. Ochoa K, Nunez J, Wang VJ. Los Angeles phonospirometry technique: creating a nomogram that correlates with peak expiratory flow measurements in children. *J Asthma*. 2015; 27:1-6.
22. Saksiriwuttho P, Duangkum C, Ratanasiri T, Komwilaisak R. Nomogram of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity at 20-37 weeks of gestation at Srinagarind Hospital. *J Med Assoc Thai* 2012;95(9):1122-5.
23. Lee JY, Kim SH, Yi ST, Lee TE, Cho YA. Contemplation of the surgical nomogram of lateral rectus recession for exotropia associated with superior oblique palsy. *Korean J Ophthalmol*. 2012;26(3):195-8.
24. Mathieu R, Arango JD, Beckendorf V, Delobel JB, Messai T, Chira C et al. Nomograms to predict late urinary toxicity after prostate cancer radiotherapy. *World J Urol*. 2014;32(3):743-51.
25. Barlera S, Tavazzi L, Franzosi MG, Marchioli R, Raimondi E, Masson S et al; GISSI-HF Investigators. Predictors of mortality in 6975 patients with chronic heart failure in the Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico-Heart Failure trial: proposal for a nomogram. *Circ Heart Fail*. 2013;6(1):31-9.
26. Esposito K, Chiodini P, Maiorino MI, Capuano A, Cozzolino D, Pe-trizzo M et al. A nomogram to estimate the HbA1c response to different DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of 98 trials with 24 163 patients. *BMJ Open*. 2015;5(2):e005892.
27. Esposito K, Chiodini P, Ceriello A, Giugliano D. A nomogram to estimate the proportion of patients at hemoglobin A1c target <7% with noninsulin antidiabetic drugs in type 2 diabetes: a systematic review of 137 randomized controlled trials with 39,845 patients. *Acta Diabetol*. 2014;51(2):305-11.
28. Wong CK, Siu SC, Wan YF, Jiao FF, Yu EY, Fung CS, Wong KW, Leung AY, Lam CL. Simple Non-laboratory-based and Laboratory-based Risk Assessment Algorithms and Nomogram for Detecting Undiagnosed Diabetes Mellitus. *J Diabetes*. 2015 May 7. doi: 10.1111/1753-0407.12310.
29. Tankova T, Chakarova N, Atanassova I, Dakovska L. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score as a screening tool for impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and undetected diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 ;92(1):46-52.
30. Vandersmissen GJ, Godderis Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC) for diabetes screening in occupational health care. *Int J Occup Med Environ Health*. 2015;28(3):587-91.
31. Vicente-Herrero MT, Ramírez MV, López-González AA, Terradillos MJ, Capdevila L, Torres I et al. El paciente diabético como trabajador especialmente sensible en medicina del trabajo. *Revista Ciencia & Trabajo*. 2010; 12(37):376-9.
32. Vicente-Herrero MT, Sánchez-Juan C, Terradillos-García MJ, Aguilar-Jiménez E, Capdevila-García L , Ramírez-Iñiguez de la Torre MV et al . Minusvalía e Incapacidad en diabetes y sus complicaciones, una revisión desde la legislación española. *Avances en Diabetología*.2010;26 (6):451-6
33. Vicente-Herrero MT, Aguilar Jiménez E, Terradillos García MJ , Capdevila- García L , Ramírez-Iñiguez de la Torre MV, López-González AA, et al. Diabetes, accidente de trabajo y daño laboral. Una revisión desde la legislación española en prevención de riesgos laborales. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48 (4): 457-63
34. Vicente-Herrero MT, Capdevila-García L, Ramirez-Iñiguez de la Torre MV, Terradillos-García MJ, Lopez-Gonzalez AA. La diabetes, sus terapias y los riesgos laborales. *Educación diabetológica profesional* 2011;XXI(1):14-21.
35. Vicente-Herrero MT, Torres-Alberich JI, López-González AA, Ramírez-Iñiguez de la Torre MV, Terradillos-García MJ, Capdevila-García L et al. Treinta años de diabetes en la jurisprudencia española (revisión 1979-2009). *Medicina del Trabajo*; 2010; 19(1):25-33.
36. Vicente-Herrero MT, Terradillos-García MJ, Capdevila-García L, Ramírez-Iñiguez de la Torre MV, López-González AA. costs of temporary disability in Spain related to diabetes mellitus and its complications. *Endocrinol Nutr*. 2013;60(8):447-55.

# Apoptotic and necrotic basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spines alteration after acute and long-term chlorpyrifos exposure: Legal implications of the use of toxicogenomic profile as a biomarker of harmful effects induced under subclinical doses

*Muerte de neuronas colinérgicas de la región basal por necrosis y apoptosis, así como alteración de la densidad de espinas dendríticas tras la exposición aguda y a largo plazo a clorpirifos: Implicaciones legales del uso del perfil toxicogenómico como biomarcador de efectos dañinos inducidos a dosis subclínicas*

**Paula Moyano<sup>1</sup>, Javier del Pino<sup>1</sup>, María José Anadón<sup>1</sup>, José Manuel García<sup>1</sup>, María Jesús Díaz<sup>1</sup>, Gloria Gómez<sup>1</sup>, Jimena García<sup>2</sup>, María Teresa Frejo<sup>1</sup> and Miguel Andrés Capó<sup>1</sup>**

1. Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

2. Department of Pharmacology, Health Sciences School, Alfonso X University, 28691, Madrid, Spain.

## Correspondencia

Javier del Pino PhD

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria

Departamento de Toxicología y Farmacología

Avda. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid. Spain

Tel.: 91 355 09 20 – E-mail: jdelpino@pdi.ucm.es

Recibido: 13 – I – 2016

Aceptado: 21 – III – 2016

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.31.01.24

## Abstract

**Introduction:** Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphate insecticide reported to induce both after acute and repeated exposure learning and memory dysfunctions, although the mechanism is not completely known. CPF produces basal forebrain cholinergic neuronal loss, involved on learning and memory regulation, which could be the cause of such cognitive disorders. This effect was reported to be mediated through apoptotic process, although neuronal necrosis was also described after CPF exposure. Otherwise, neuronal dendritic spines were reported to be also involved on learning and memory process regulation and their alteration could also contribute to this effect. In this regard, CPF has been reported to induce an alteration in the dendritic spines density in the prefrontal cortex and hippocampus after acute and repeated exposure to subclinical doses respectively, thus their alteration in basal forebrain cholinergic neurons could also mediate cognitive disorders.

**Objectives and methods:** Accordingly, we hypothesized that CPF induces basal forebrain cholinergic dendritic spine alteration at low concentrations and at higher concentrations produces necrotic and apoptotic cell death. We evaluated in septal SN56 basal forebrain cholinergic neurons, the CPF effect after 24 h and 14 days exposure on dendritic spines, the necrosis induction and the apoptotic and necrotic gene expression pathways.

**Results:** This study shows that CPF induces after acute and long-term exposure an alteration of dendritic spines at lower concentrations than which induces cell death. Evaluation of cell death pathways and genes related to dendritic spine plasticity revealed that some of them are altered at lower concentrations than which produces the effects observed and below the No Observed Adverse Effect (NOAEL).

**Conclusions:** The present finding suggest that the use of gene expression profile could be a more sensitive and accurate way to determine the NOAEL.

**Keywords:** Basal forebrain cholinergic neurons, chlorpyrifos, necrosis, apoptosis, dendritic spines, LOATEL, health legislation

## Resumen

**Introducción:** El clorpirifos (CPF) es un insecticida organofosforado que tras la exposición aguda y repetida, induce disfunciones de los procesos de aprendizaje y memoria, aunque el mecanismo por el cual se produce este efecto no se conoce por completo. El CPF produce en la región cerebral basal anterior la pérdida de neuronas colinérgicas, que participan en la regulación de los procesos de aprendizaje y la memoria, pudiendo ser esta la causa de tales trastornos cognitivos. Se ha observado que este efecto está mediado a través del proceso de apoptosis, aunque también se ha descrito que se produce necrosis neuronal tras la exposición a CPF. Por otra parte, también se ha demostrado que las espinas dendríticas participan en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria y su disrupción también podría contribuir a la alteración de dichos procesos. En este sentido, se ha descrito que el CPF altera la densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo tras la exposición aguda y repetida a dosis subclínicas, respectivamente, por lo que su perturbación en las neuronas colinérgicas de la región basal anterior también podría mediar estos trastornos cognitivos.

**Objetivos y métodos:** De acuerdo con lo expuesto, nosotros hipotetizamos que el CPF induce, en las neuronas colinérgicas de la región basal anterior, una alteración de las espinas dendríticas a bajas concentraciones y a concentraciones más altas produce muerte celular por apoptosis y necrosis. Evaluamos en neuronas colinérgicas SN56 de la región basal anterior, el efecto del CPF



después de 24 horas y 14 días de exposición sobre las espinas dendríticas, la inducción de necrosis y las vías de expresión génica que median la inducción de apoptosis y necrosis.

**Resultados:** Este estudio demuestra que el CPF induce, tras la exposición aguda y a largo plazo, una alteración de las espinas dendríticas, a concentraciones más bajas de aquellas a las que induce la muerte celular. La evaluación de las vías de muerte celular y los genes relacionados con la plasticidad de la espina dendrítica reveló que algunos de estos genes están alterados a concentraciones más bajas de aquellas a las que producen muerte celular o alteración de las espinas dendríticas y por debajo del Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL).

**Conclusiones:** El presente estudio sugiere que el uso del perfil de expresión génica podría ser una manera más sensible y precisa para la determinación del NOAEL.

**Palabras clave:** Neuronas colinérgicas de la región basal anterior basal, clorpirifos, necrosis, apoptosis, espinas dendríticas, LOATEL, regulación sanitaria

## Introduction

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphate (OP) insecticide widely used in domestic, agricultural, and industrial applications<sup>1</sup>. Human epidemiological studies have related OPs occupational exposure with neurological and neuro-behavioral deficits including impairments of learning and memory process<sup>2,3</sup>. In this regard, CPF has been shown to produce learning deficits in rats, after acute and repeated administration<sup>4-6</sup>. It has been suggested that inhibition of cholinesterase activity by CPF could be involved in these effects<sup>7</sup>. However, human studies of occupational exposure to OPs often fail to find a significant correlation between blood cholinesterase activity and neuro-behavioral deficits<sup>2,3</sup>.

Otherwise, degeneration of septal cholinergic neurons that project to hippocampus has been linked to memory deficits that result from cholinergic modulation of hippocampal synaptic circuit loss<sup>8</sup>. Degeneration of septo-hippocampal cholinergic neurons, as seen in AD and other neurodegenerative diseases, results in loss of cholinergic modulation of septo-hippocampal synaptic circuits that leads to memory deficits<sup>8</sup>. In fact, the severity of memory deficit is strongly correlated with the degree of cholinergic cell loss<sup>9</sup>. Thus, cholinergic neuronal loss in this region could be related with CPF impairment of memory function among other actions<sup>10</sup>.

In this regard, Lopez-Granero et al<sup>4</sup> reported that chronic dietary exposure in rats produced cognitive and emotional disorders related with changes in AChE forms. In addition, Del Pino et al<sup>11</sup> reported that CPF induced, after acute and long-term exposure, apoptotic cell death in cholinergic neurons from the basal forebrain and this effect was independent of AChE inhibition and acetylcholine level alteration, but was mediated partially by AChE-R and AChE-S overexpression, supporting the idea that the cognitive disorders reported after CPF exposures may be produced by induction of basal forebrain cholinergic cell loss mediated partially through AChE forms alteration. In addition, CPF has also been reported to induce neuronal cell death through necrosis process after CPF acute and long-term exposure<sup>12,13</sup>, thus the cell death observed could be also mediated through necrosis induction by CPF. In this regard, previously Del Pino et al<sup>14</sup> reported

that AChE-R and AChE-S overexpression induces at low concentrations apoptosis and necrosis at high concentrations in basal forebrain cholinergic neurons, supporting our hypothesis.

Otherwise, loss of dendritic spines has been reported in neurodegenerative disorders as AD affecting mostly selective neuronal networks of critical importance for memory and cognition, such as the basal forebrain cholinergic system, the medial temporal regions, the hippocampus and many neocortical association areas<sup>15</sup> inducing cognitive disorders<sup>16,17</sup>. In this regard, CPF has been reported to induce an alteration in the dendritic spines density in the prefrontal cortex and hippocampus after acute and repeated exposure to subclinical doses respectively<sup>18,19</sup>. Moreover, cognitive disorder has been reported to be produced from subclinical doses and from a lower doses from which basal forebrain cholinergic cell loss has been reported<sup>20</sup>, as happens with dendritic spines alteration.

According to these data, we hypothesized that CPF induces basal forebrain cholinergic dendritic spine alteration at low concentrations and at higher concentrations produces neuronal loss through necrosis and apoptosis. The present work intends to study the CPF mechanisms of basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spine alteration, due to the importance of these effects to explain CPF toxicity on cognitive disorders and neurodegenerative diseases symptoms like. To reach this aim we treated with CPF for 24 h or repeatedly for 14 days, wild type or transfected with siRNA for AChE, SN56 cells from basal forebrain as an *in vitro* model of cholinergic neuronal cells from this region to research the CPF effect on dendritic spines and expression of genes involved in dendritic outgrowth, the necrotic cell death induction through AChE splice variants alteration and the apoptotic and necrotic gene expression pathways related to cell death process.

## Materials and methods

### Chemicals

The compounds chlorpyrifos (99.99%), poly-L-lysine, dibutyryl-cAMP, retinoic acid, 3,3'-diaminobenzidinetetrachloride, anti-microtubule-associated protein-2 (MAP-2) monoclonal antibody and paraformaldehyde were obtained

ned from Sigma (Madrid, Spain). All other chemicals were reagent grade of the highest laboratory purity available.

### **Culture of SN56 cells**

SN56 cells, a cholinergic murine neuroblastoma cell line derived from septal neurons<sup>21</sup>, were used as a model of cholinergic neurons from basal forebrain to evaluate CPF toxic effects on this specific type of neurons and the mechanisms through which they are induced. The cells were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine (Sigma, Madrid, Spain), and 1 mM sodium pyruvate. Medium was changed every 48 h<sup>22</sup>. Differentiation of the cells was achieved by culturing for 3 days with 1 mM dibutyryl-cAMP and 1 µM retinoic acid as described<sup>23,24</sup>, which produce morphological maturation and 3-4-fold increase of ChAT activity and acetylcholine level in the cells. Differentiated cells have been reported to be more sensitive to neurotoxic compound that affects cholinergic pathways<sup>23,24</sup>.

In order to determine the dendritic spine density, the cellular lactate dehydrogenase (LDH) content in wild type and siRNA AChE transfected cells, the apoptotic and necrotic main gene expression pathways, and the expression of the main genes related with dendritic spines plasticity, cells were seeded in 6-well plates at a density of 10<sup>6</sup> cells/well. Cells were treated for 24 h or for 14 days with CPF in concentrations between 0.01 µM to 70 µM and 0.01 µM to 40 µM respectively. At least 3 replicate wells/treatment were used. A vehicle group was employed in parallel for each experiment as a control.

In the literature, 10–100 µM chlorpyrifos has been routinely used to study chlorpyrifos toxicity<sup>25–28</sup>, although there are not enough data regarding the relative distribution or concentration of CPF in human brain after acute and chronic exposure. In addition, studies have shown that the blood plasma concentration of CPF from human volunteers were similar to 0.1 µM<sup>29</sup>. Moreover, whole-body molar concentrations associated with the doses of CPF (2.5–25.0 mg/kg/day) used in behavioral experiments have been reported to be calculated as ranging between approximately 7.0 and 8.0 to 70.0 and 80.0 µM<sup>20</sup>. The NOAEL set for CPF is 0.1 mg/kg bw per day<sup>30</sup>, which would be around 0.3 µM concentration in the tissues according to Terry et al<sup>20</sup>. The used doses appear to be relevant to study the cognitive disorders according to all described above. Furthermore, we chose CPF 30 µM concentration, which was the lowest concentration observed to induce cell death after acute exposure<sup>11</sup>, to study the CPF necrotic and apoptotic mechanisms.

### **Lactate dehydrogenase (LDH) assay**

The necrotic cell death was assessed by measuring the LDH released into the culture medium using Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, Madrid,

Spain) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the culture medium was removed and pipetted into 96-well plates. The Master Mix reagent was added, and after 3 min colorimetric intensity was determined at 450 nm over every 5 min using a microplate spectrophotometer (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain).

### **Gene knockdown**

SN56 cells were transfected with siRNAs in 6-well plates (1 x10<sup>6</sup> cells/well) using HiPerfect Transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Barcelona, Spain). Two sets of siRNA duplexes (Qiagen, Barcelona, Spain) homologous to mouse AChE sequence were designed using the Hi-Performance Design Algorithm (Novartis AG) and were purchased from Qiagen (catalog numbers GS11423 a). As a transfection control, an All Stars Negative Control siRNA (Qiagen, Barcelona, Spain) was used. 48 h after transfection, the efficiency of siRNA-mediated AChE was determined by RT-PCR using primers specific for mouse AChE mRNA (Qiagen, Barcelona, Spain). The effects of AChE knockdown on cell injury were tested by LDH cell viability assay. After 24 h of incubation with the siRNAs, the cells were washed with PBS and incubated for a further 24 h or 14 days in culture medium with or without CPF.

### **Protein determination**

At the end of the treatments, SN56 cells were washed with pre-chilled PBS, collected by scrapping, and lysed using RIPA buffer (Thermo Scientific, Madrid, Spain) with freshly added protease inhibitors cocktail (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). After centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C, cell lysate supernatant was collected. Protein concentration was assayed using a BCA kit (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) and normalized.

### **Dendritic spines density determination.**

SN56 differentiated cell were suspended in DEMEM medium. Cells suspension was plated at a density of 10<sup>6</sup> cell/ml onto poly-L-lysine 0.10 mg/mL coated glass coverslips (22 mm diameter) placed in plastic Petri dishes (35 mm diameter) coated with poly-L-lysine. Coverslips with adhered SN56 cells were fixed with ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min and then placed into 0.5 M potassium/PBS (KPBS) until use. Coverslips were washed three times in KPBS, and cells were permeabilized with 50% ethanol for 1 h and blocked with 10% normal goat serum in 0.1% Triton X-100-supplemented KPBS (0.1% KPBST). After three 15 min KPBS washes, coverslipped cells were then incubated overnight in primary anti-microtubule-associated protein-2 (MAP-2) monoclonal antibody at 1:1000 dilution in 0.1% KPBST at 4°C. Three washes of 0.1% KPBST was then followed by immersion for 2 h in secondary anti-mouse antibody conjugated to biotin (Vector Laboratories) diluted 1:500 in 0.1% KPBST, washed in 0.1% KPBST, and visualized using Vectastain-avidin-biotin horseradish peroxidase complex (Vector

Laboratories, Barcelona, Spain) at 1:1000 dilution in 0.1% KPBST for 1 h before staining with 0.05% (w/v) 3,3'-diaminobenzidinetetrachloride, 0.005% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 2.5% (w/v) nickel (II)sulfate in 0.175 M sodium acetate<sup>31</sup>. MAP-2 protein is not localized in dendritic spines but allows for accurate quantification of dendritic spine density.

### Real-time PCR analysis

Total RNA was extracted using the Trizol Reagent method (Invitrogen, Madrid, Spain). The final RNA concentration was determined using a spectrophotometer Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) and the quality of total RNA samples was assessed using an ExperionLabChip (Bio-Rad, Madrid, Spain) gel. First-strand cDNA was synthesized with 1000 ng of cRNA by using a PCR array first strand-synthesis kit (C-02; SuperArray-Bioscience, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions and including a genomic DNA elimination step and external RNA controls. After reverse transcription, we performed QPCR using the mouse Cell Death PathwayFinder PCR Array (PAMM-212Z) used to analyze mRNA levels of 84 key genes involved in cell death, in a 96-well format, according to the manufacturer's instructions (SABiosciencesInc). Reactions were run on a CFX96 using Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-012 (SABiosciencesInc). The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Relative changes in gene expression were calculated via SuperArray PCR Array Data Analysis Software using the cycle threshold (Ct) method with normalization of the raw data to several housekeeping genes. The expression data are presented as actual change multiples. We also performed QPCR using prevalidated primer sets (SuperArray Bioscience) for mRNAs encoding Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95; PPH01848A), Spinophilin (SPN; PPM34114A), Synaptophysin (SYP; PPM03241A), N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit NR1 (NMDAR1; PPH01823F), AChE (PPM35356A), and ACTB (PPM02945B). We used ACTB as an internal control for normalization. Reactions were run on a CFX96 using Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-012 (SuperArray Bioscience). The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 72°C for 30 seconds. Relative changes in gene expression were calculated using the Ct (cycle threshold) method. The expression data are presented as actual change multiples<sup>32</sup> (Livak and Schmittgen 2001).

We chose PSD95, NMDAR1, SPN and SYP genes to determine the effect of CPF on dendritic spine density, because both genes are the main regulators of dendritic spine plasticity<sup>33,35</sup>.

### Statistical analysis

At least three replicates for each experimental condition were performed, and the presented results were representative of these replicates. Data are represented as

means ± standard deviation (SD). Comparisons between experimental and control groups were performed by Student's *t* test and ANOVA analyses followed by the Tukey post-hoc test. Statistical difference was accepted when *p* ≤ 0.05. Statistical analysis of data was carried out by computer using GraphPad software.

## Results

### Effect of CPF on SN56 cell viability

We used the LDH assay to evaluate cell survival after 24 h and 14 days exposure to CPF at increasing concentrations. LDH is released from cells as a result of loss of plasma membrane integrity and it is indicative of necrotic cell death mechanism. An increased LDH release to the medium was observed in a dose dependent way after 24 h and long-term CPF exposure from 50 μM and 20 μM concentrations respectively compared with vehicle-treated cells (control negative) (Figure 1). Moreover, after CPF treatment of SN56 AChE silenced cells amelioration in LDH release was also observed (Figure 1). There was no significant difference between data of vehicle-treated cells and control cells.

### AChE gene knockdown

To investigate the protection afforded by the knockdown of the AChE during cell death, we introduced siRNA oligonucleotides into SN56 cells by transfection directed against AChE. Transfection of cells with control siRNA showed no effect on AChE gene expression or cell viability, but the AChE siRNA caused large reductions in AChE gene expression (Figure 2). Cultures transfected with control siRNA compared with culture transfected against AChE, showed no effect in cell viability by LDH assays (Figure 2).

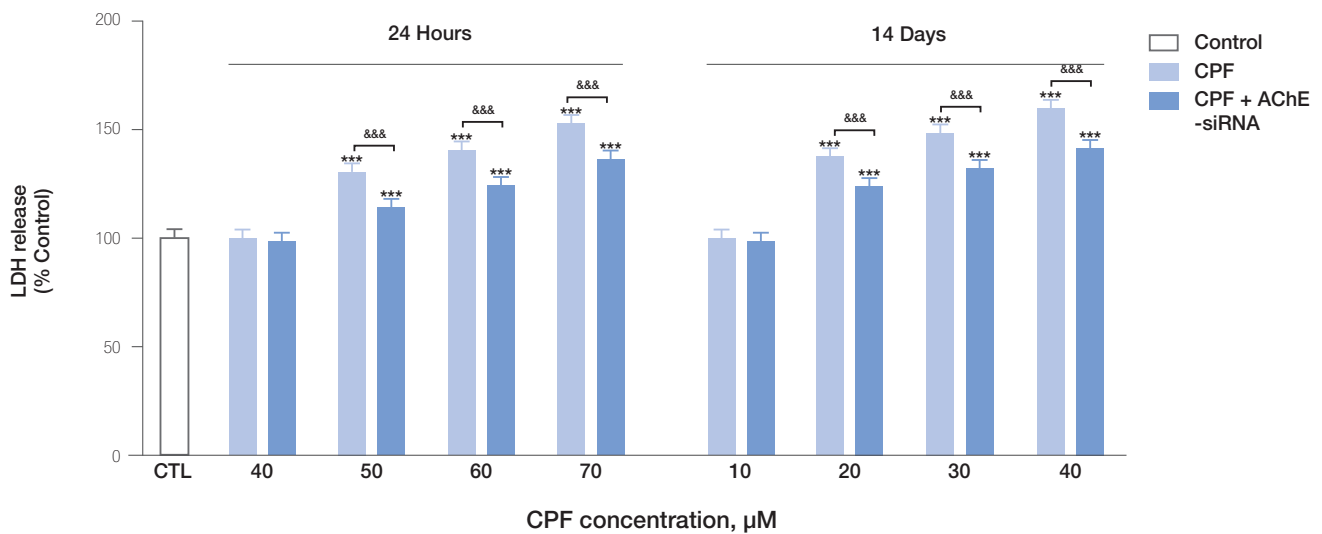
### Effect of CPF on dendritic spine density

We observed that CPF induces acute (from 1 μM) and long-term (from 0.1 μM), concentration-dependent, reduction in the number of dendritic spine-like processes per length of neurite compared with vehicle treated on SN56 cultured neurons (Figure 3). There was no effect of treatment on mean soma size or the number of neurites per neuron (Data not shown).

### Real-time PCR analysis

After incubation for 24 h and 14 days with 0.01 μM and 30 μM concentrations of CPF in SN56 cells, necrotic and apoptotic gene expression profile of CPF was analyzed with our Real-time PCR arrays. Moreover, the CPF effect on AChE and the main regulator dendritic spines synaptic plasticity gene expression in AChE silenced Cells and wild type respectively were analyzed. The gene expression profile of CPF was significantly different from normal control. The results show that after 24 h and 14 days exposure at 0.01 μM concentration of CPF only the expression of TNF, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF11B proapoptotic

**Figure 1:** CPF (0.01 to 70  $\mu\text{M}$ ) effect on cell viability of SN56 wild type or AChE silenced was determined by LDH release assays. Results are expressed as percentages of LDH release after subtracting the control values. Data represents the mean  $\pm$  SD of three separate experiments from cells of different cultures, each one performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$  compared to control.  $\Delta\Delta\Delta p \leq 0.001$  compared to CPF treatment.

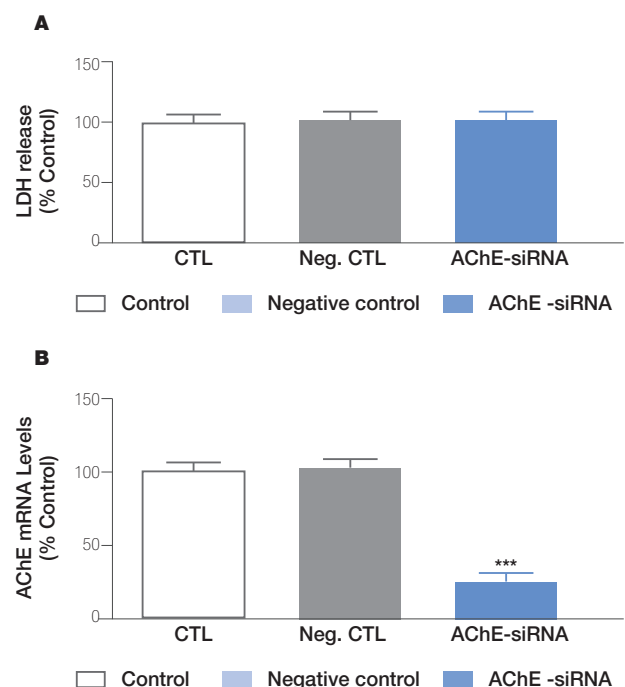


genes, TRAF2, BICR2 and BIRC3 antiapoptotic genes and MAG, S100A7A and KCN1P1 genes related with necrosis process was induced (Table I and II). Moreover, after 24 h exposure at 30  $\mu\text{M}$  concentration of CPF 27 genes were up-regulated and 5 genes were down-regulated with a fold change higher and lower than 1.5 respectively for CPF compared with normal control (Table I). In addition, after and 14 days exposure at 30  $\mu\text{M}$  concentration of CPF 43 genes were up-regulated and 7 genes were down-regulated with a fold change higher and lower than 1.5 respectively for CPF compared with normal control (Table II). Finally, we observed that after acute (from 0.01  $\mu\text{M}$ ) and long term (from 0.01  $\mu\text{M}$ ) CPF exposure, a concentration-dependent reduction in PSD95 and SYP gene expression (Figure 4A and 4B), but we only observed a concentration-dependent gene expression reduction of SPN and NMDANR1 after acute exposure from 1  $\mu\text{M}$  CPF concentration and after long-term exposure from 0.1  $\mu\text{M}$  CPF concentrations (Figure 4C and 4D).

## Discussion

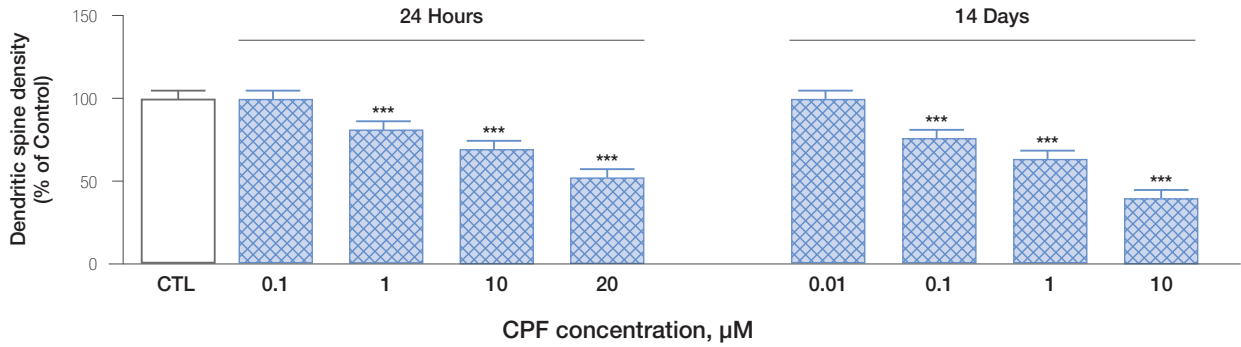
In the present work we show that CPF induces acute (from 50  $\mu\text{M}$ ) and long-term (from 20  $\mu\text{M}$ ), concentration-dependent, necrotic cell death on septal SN56 cholinergic basal forebrain neurons. These results are supported by previous works which showed that CPF induced neuronal cell death through necrosis process after CPF acute and long-term exposure<sup>12,13</sup>. Previously, we found that CPF induces acute (from 30  $\mu\text{M}$ ) and long-term (from 1  $\mu\text{M}$ ), concentration-dependent, cell death on septal SN56 cholinergic basal forebrain neurons, showing that apoptotic process is involved in this effect mediated partially by AChE variants overexpression<sup>11</sup>. Moreover, we show that the increase in LDH release was mediated partially by AChE overexpression. In this regard, Del Pino et

**Figure 2:** Downregulation of AChE in SN56 cells and its impact on cell viability and gene expression was determined. Control: SN56 cells transfected without siRNA. Negative (Neg.) control: SN56 cells transfected with scrambled siRNA. AChE-siRNA: transfected with siRNA against AChE. (A) LDH assays shows that AChE downregulation did not significantly induce cell damage after 48 h. (B) AChE downregulation could be detected by RT-PCR analysis 48 h after transfection. Values are given as mean  $\pm$  SD of three separate experiments from cells of different cultures, each one performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$  compared to control.

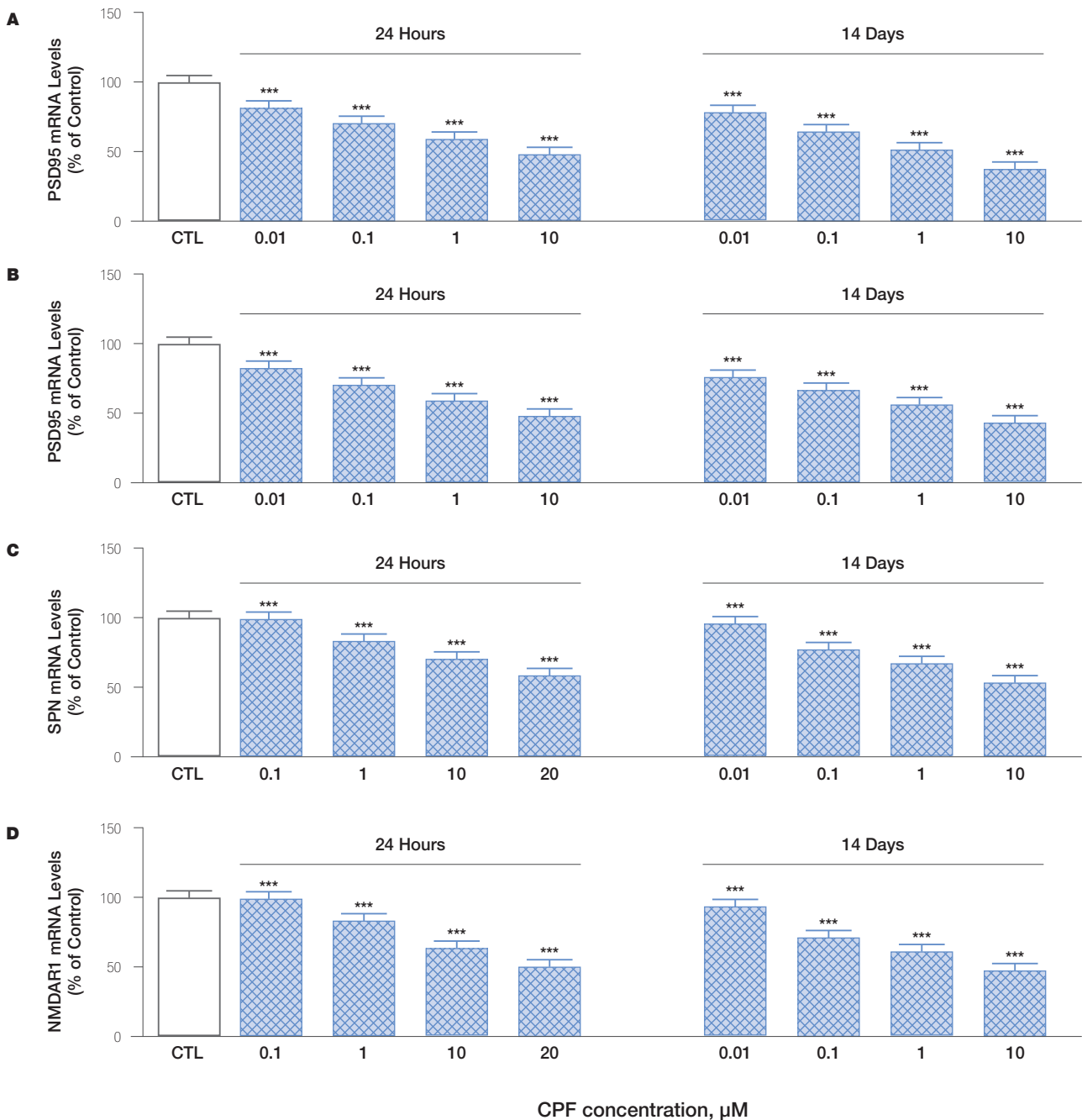


al<sup>14</sup> reported that AChE-R and AChE-S overexpression induces at low concentrations apoptosis and necrosis at higher concentrations in basal forebrain cholinergic neurons, supporting our results. Basal forebrain cholinergic neurons loss has been related with cognitive deficits<sup>36-40</sup>. In fact, the severity of memory deficit is strongly corre-

**Figure 3:** Effects of different CPF concentrations for 24 h or 14 days on dendritic spine density were determined in neurite SN56 cells. Dendritic spine density is indicated as % of control (CTL, white column). Data represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments in triplicate. \*\*\* $p$ <0.001 compared to control.



**Figure 4:** Shows results from real-time PCR arrays targeting (A) PSD95, (B) SYP, (C) SPN and (D) NMDAR1 genes after 24 h and 14 days CPF treatment. PSD95, SYP, SPN and NMDAR1 gene expression was compared with controls. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 6 samples. Levels were measured using QPCR. ACTB was used as an internal control. \*\*\* $p$ <0.001, significantly different from controls.



**Table 1:** Fold-change of cell death related genes after 24 h CPF treatment. Values on red or blue mean a fold change upper or downer than 2

Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change		Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change	
		0.01µM	30µM			0.01µM	30µM
ABL1	NM_005157	1,11 <sup>b</sup>	1,23 <sup>a</sup>	FOXI1	NM_012188	1,12 <sup>a</sup>	0,07
AKT1	NM_005163	1,02	1,05	GAA	NM_000152	1,09	1,19 <sup>a</sup>
APAF1	NM_001160	1,15 <sup>b</sup>	2,52 <sup>a</sup>	GADD45A	NM_001924	1,11 <sup>a</sup>	2,24 <sup>a</sup>
APP	NM_000484	1,16 <sup>a</sup>	1,41 <sup>a</sup>	GALNT5	NM_014568	1,03	1,05
ATG12	NM_004707	1,17 <sup>a</sup>	1,13 <sup>a</sup>	GRB2	NM_002086	1,06	1,09
ATG16L1	NM_017974	1,21 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	HSPBAP1	NM_024610	1,05	1,13 <sup>a</sup>
ATG3	NM_022488	1,04	1,11 <sup>a</sup>	HTT	NM_002111	1,06	1,23 <sup>a</sup>
ATG5	NM_004849	1,01	1,21 <sup>a</sup>	IFNG	NM_000619	1,07	1,08
ATG7	NM_006395	1,04	1,04	IGF1	NM_000618	1,01	1,14 <sup>a</sup>
ATP6V1G2	NM_130463	1,02	1,02	IGF1R	NM_000875	1,02	1,09
BAX	NM_004324	1,05	2,54 <sup>a</sup>	INS	NM_000207	1,07	1,11 <sup>b</sup>
BCL2	NM_000633	1,10 <sup>b</sup>	1,15 <sup>a</sup>	IRGM	NM_001145805	1,13 <sup>b</sup>	1,28 <sup>a</sup>
BCL2A1	NM_004049	1,02	1,04	JPH3	NM_020655	1,09	1,06
BCL2L1	NM_138578	1,13 <sup>a</sup>	2,23 <sup>a</sup>	KCNIP1	NM_014592	2,51 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>
BCL2L11	NM_006538	1,01	2,32 <sup>a</sup>	MAG	NM_002361	2,12 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>
BECN1	NM_003766	1,03	1,06	MAP1LC3A	NM_181509	1,08	2,35 <sup>a</sup>
BIRC2	NM_001166	1,72 <sup>a</sup>	-1,43 <sup>a</sup>	MAPK8	NM_002750	1,07	1,17 <sup>b</sup>
BIRC3	NM_001165	1,69 <sup>a</sup>	-1,59 <sup>a</sup>	MCL1	NM_021960	1,14 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>
BMF	NM_033503	1,06	1,06	NFKB1	NM_003998	1,02	1,06
C1orf159	NM_017891	1,13 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	NOL3	NM_003946	1,05	1,04
CASP1	NM_033292	1,05	2,21 <sup>a</sup>	OR10J3	NM_001004467	1,01	1,07
CASP2	NM_032982	1,01	1,09	PARP1	NM_001618	1,11 <sup>a</sup>	1,03
CASP3	NM_004346	1,05	1,57 <sup>a</sup>	PARP2	NM_005484	1,06	1,01
CASP6	NM_032992	1,06	1,25 <sup>a</sup>	PIK3C3	NM_002647	1,07	1,05
CASP7	NM_001227	1,02	2,31 <sup>a</sup>	PVR	NM_006505	1,06	1,10 <sup>a</sup>
CASP9	NM_001229	1,01	1,69 <sup>a</sup>	RAB25	NM_020387	1,03	1,02
CCDC103	NM_213607	1,07	1,05	RPS6KB1	NM_003161	1,27 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>
CD40	NM_001250	1,08	3,31 <sup>a</sup>	S100A7A	NM_176823	2,17 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>
CD40LG	NM_000074	1,06	3,56 <sup>a</sup>	SNCA	NM_000345	1,06	1,25 <sup>a</sup>
CFLAR	NM_003879	1,21 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	SPATA2	NM_006038	1,12 <sup>a</sup>	2,41 <sup>a</sup>
COMMD4	NM_017828	1,02	1,02	SQSTM1	NM_003900	1,17 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup>
CTSB	NM_001908	1,13 <sup>a</sup>	1,05	SYCP2	NM_014258	1,03	1,66 <sup>a</sup>
CTSS	NM_004079	1,08	1,04	TMEM57	NM_018202	1,11 <sup>a</sup>	1,15 <sup>a</sup>
CYLD	NM_015247	1,12 <sup>a</sup>	1,08	TNF	NM_000594	1,53 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>
DEFB1	NM_005218	1,01	1,01	TNFRSF10A	NM_003844	1,61 <sup>a</sup>	1,78 <sup>a</sup>
DENND4A	NM_005848	1,03	1,33 <sup>a</sup>	TNFRSF11B	NM_002546	2,01 <sup>b</sup>	2,37 <sup>b</sup>
DFFA	NM_004401	1,05	1,09	TNFRSF1A	NM_001065	1,75 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>
DPYSL4	NM_006426	1,01	1,05	TP53	NM_000546	1,10	1,67 <sup>a</sup>
EIF5B	NM_015904	1,03	1,33 <sup>b</sup>	TRAF2	NM_021138	2,22 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>
ESR1	NM_000125	1,04	1,07	TXNL4B	NM_017853	1,01	1,69 <sup>a</sup>
FAS	NM_000043	1,02	2,31 <sup>a</sup>	ULK1	NM_003565	1,02	1,04
FASLG	NM_000639	1,06	2,13 <sup>a</sup>	XIAP	NM_001167	1,05	1,01

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  compared to the control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared to the control.

lated with the degree of cholinergic cell loss<sup>9</sup>. Thus, the observed effects on cholinergic basal forebrain neurons may be, in part, responsible for the learning deficits and neurodegenerative disease symptoms like observed after acute and long-term exposure to CPF.

Moreover, after acute (from 0.01 µM) and long-term (from 0.01 µM) CPF exposure we only observed an induction in the gene expression of TNF, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF11B proapoptotic genes, TRAF2, BIRC2 and BIRC3 antiapoptotic genes and MAG, S100A7A and KCN1P1 genes related with necrosis process. Apoptosis is triggered through the extrinsic pathway when extracellular stimuli and the cytokines CD40L, FASLG, TNFSF10 and TNF- $\alpha$  inducing cytokine receptors, including FAS receptor and tumor necrosis factor super family receptors (TNFRs) like TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10B and CD40, are activated<sup>41,42</sup>. Inhibitors of apoptosis

BIRC3 and BIRC2, through TRAF2, can prevent its activation<sup>43</sup>. According to this, CPF could activate cell death through extrinsic partway, but was blocked by activation of apoptosis inhibitors. Otherwise, MAG and S100A7A genes have been related with necrosis induction<sup>44</sup> and KChIP1 expression has been reported to play a protective role against cell death and its downregulation leads to the induction of necrotic cell death<sup>45</sup>. Therefore, KChIP1 overexpression after CPF exposure could be a protective mechanism against cell injury produced by CPF.

In addition, after acute (30 µM) CPF exposure the gene expression resultant showed a fold change greater or lower than 1.5 in the expression of the 29 genes related to apoptosis and necrosis for CPF treatment. Our research showed that CPF increased the expression of CD40, CD40LG, FAS, FASLG, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF1A, TNFRSF11B, which likely led to induce

**Table II:** Fold-change of cell death related genes after 14 days CPF treatment. Values on red or blue mean a fold change upper or downer than 2

Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change		Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change	
		0.01µM	30µM			0.01µM	30µM
ABL1	NM_005157	1,15 <sup>b</sup>	1,32 <sup>a</sup>	FOXI1	NM_012188	1,15 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a</sup>
AKT1	NM_005163	1,07	1,08	GAA	NM_000152	1,04	1,32 <sup>a</sup>
APAF1	NM_001160	1,18 <sup>a</sup>	2,56 <sup>a</sup>	GADD45A	NM_001924	1,14 <sup>a</sup>	2,22 <sup>a</sup>
APP	NM_000484	1,19 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>	GALNT5	NM_014568	1,06	-1,64
ATG12	NM_004707	1,18 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	GRB2	NM_002086	1,04	2,51 <sup>a</sup>
ATG16L1	NM_017974	1,19 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>	HSPBAP1	NM_024610	1,07	1,69 <sup>a</sup>
ATG3	NM_022488	1,07	1,19 <sup>a</sup>	HTT	NM_002111	1,03	1,13 <sup>a</sup>
ATG5	NM_004849	1,04	1,62 <sup>a</sup>	IFNG	NM_000619	1,05	1,02
ATG7	NM_006395	1,03	1,84 <sup>a</sup>	IGF1	NM_000618	1,06	1,16 <sup>a</sup>
ATP6V1G2	NM_130463	1,01	1,59 <sup>a</sup>	IGF1R	NM_000875	1,03	1,05
BAX	NM_004324	1,09	2,69 <sup>a</sup>	INS	NM_000207	1,06	1,11 <sup>a</sup>
BCL2	NM_000633	1,13 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>	IRGM	NM_001145805	1,10 <sup>b</sup>	-1,29 <sup>a</sup>
BCL2A1	NM_004049	1,05	1,08	JPH3	NM_020655	1,05	2,38 <sup>a</sup>
BCL2L1	NM_138578	1,08	2,27 <sup>a</sup>	KCNIP1	NM_014592	2,62 <sup>a</sup>	-3,67 <sup>a</sup>
BCL2L11	NM_006538	1,07	2,34 <sup>a</sup>	MAG	NM_002361	2,25 <sup>a</sup>	-3,42 <sup>a</sup>
BECN1	NM_003766	1,07	1,09	MAP1LC3A	NM_181509	1,04	2,42 <sup>a</sup>
BIRC2	NM_001166	1,86 <sup>a</sup>	-1,62 <sup>a</sup>	MAPK8	NM_002750	1,02	1,21 <sup>b</sup>
BIRC3	NM_001165	1,82 <sup>a</sup>	-1,53 <sup>a</sup>	MCL1	NM_021960	1,10 <sup>b</sup>	1,29 <sup>a</sup>
BMF	NM_033503	1,09	2,95 <sup>a</sup>	NFKB1	NM_003998	1,03	1,07
C1orf159	NM_017891	1,12 <sup>a</sup>	3,76 <sup>a</sup>	NOL3	NM_003946	1,06	1,02
CASP1	NM_033292	1,02	2,19 <sup>a</sup>	OR10J3	NM_001004467	1,05	-3,67 <sup>a</sup>
CASP2	NM_032982	1,03	1,15 <sup>a</sup>	PARP1	NM_001618	1,13 <sup>a</sup>	1,74 <sup>a</sup>
CASP3	NM_004346	1,07	1,72 <sup>a</sup>	PARP2	NM_005484	1,02	1,81 <sup>a</sup>
CASP6	NM_032992	1,04	1,23 <sup>a</sup>	PIK3C3	NM_002647	1,05	2,28 <sup>a</sup>
CASP7	NM_001227	1,03	2,22 <sup>a</sup>	PVR	NM_006505	1,08	1,49 <sup>a</sup>
CASP9	NM_001229	1,06	1,68 <sup>a</sup>	RAB25	NM_020387	1,04	1,04
CCDC103	NM_213607	1,13 <sup>a</sup>	2,31 <sup>a</sup>	RPS6KB1	NM_003161	1,15 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
CD40	NM_001250	1,08	4,48 <sup>a</sup>	S100A7A	NM_176823	2,28 <sup>a</sup>	-2,73 <sup>a</sup>
CD40LG	NM_000074	1,06	3,16 <sup>a</sup>	SNCA	NM_000345	1,03	1,29 <sup>a</sup>
CFLAR	NM_003879	1,21 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	SPATA2	NM_006038	1,10 <sup>b</sup>	2,36 <sup>a</sup>
COMMD4	NM_017828	1,02	2,12 <sup>a</sup>	SQSTM1	NM_003900	1,12 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
CTSB	NM_001908	1,13 <sup>a</sup>	2,52 <sup>a</sup>	SYCP2	NM_014258	1,05	1,67 <sup>a</sup>
CTSS	NM_004079	1,05	2,26	TMEM57	NM_018202	1,13 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>
CYLD	NM_015247	1,10 <sup>b</sup>	2,22 <sup>a</sup>	TNF	NM_000594	1,59 <sup>a</sup>	1,66 <sup>a</sup>
DEFB1	NM_005218	1,04	1,93 <sup>a</sup>	TNFRSF10A	NM_003844	1,72 <sup>a</sup>	1,79 <sup>a</sup>
DENND4A	NM_005848	1,01	1,35 <sup>b</sup>	TNFRSF11B	NM_002546	2,14 <sup>a</sup>	2,26 <sup>b</sup>
DFFA	NM_004401	1,03	1,03	TNFRSF1A	NM_001065	1,83 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>
DPYSL4	NM_006426	1,06	2,81	TP53	NM_000546	1,18	1,85 <sup>a</sup>
EIF5B	NM_015904	1,01	1,33 <sup>b</sup>	TRAF2	NM_021138	2,31 <sup>a</sup>	3,14 <sup>a</sup>
ESR1	NM_000125	1,02	1,01	TXNL4B	NM_017853	1,11	1,69 <sup>a</sup>
FAS	NM_000043	1,05	2,36 <sup>a</sup>	ULK1	NM_003565	1,09	1,02
FASLG	NM_000639	1,03	2,46 <sup>a</sup>	XIAP	NM_001167	1,06	1,04

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  compared to the control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared to the control.

apoptosis through extrinsic pathway. CPF increased also the expression of TRAF2 and decreased BIRC3 and BIRC2 antiapoptotic genes allowing caspases activation which expression was increased. Besides, CPF induced GADD45A, and TP53 genes expression. The P53-GADD45A pathway has been shown to primarily play a role in the control of G2-M arrest following certain DNA-damaging agents<sup>46,47</sup>, thus their induction could lead to cell arrest. Moreover, CPF increased the expression of BAX and BCL2L11 proapoptotic genes and BCL2L1 antiapoptotic gene<sup>48</sup>, further decrease the ratio BCL2/BAX which regulated the induction of apoptosis<sup>49</sup> leading to apoptosis. Finally, CPF increased the expression of CASP1, CASP3, CASP7, CASP9 which executed apoptosis. Besides, CPF increased the expression of KCNIP1, MAG and S100A7A genes related to necrosis as happened at lower concentrations indicating that necrosis is prevented.

After long-term CPF exposure (30 µM), besides the effect on the same genes commented after acute exposure, CPF increased the expression of ATP6V2, BMF, CLORF159, CCDC103, COMMD4, CTSB, STSS, CYLD, DEFB1, DPYSL4, FOXI1, GRB2, HSPBAP1, JPH3, PARP1, PARP2, PIK3C3, PVR, TXNL4B and decreased the expression of GALNT5, OR10J3, KCNIP1, MAG and S100A7A genes related to necrosis according with the research of Hitomi et al<sup>44</sup>. Our study indicates that CPF exerts its cell death effects by involving apoptosis and necrosis pathways.

Otherwise, we observed that CPF induces acute (from 1 µM) and long-term (from 0.1 µM), concentration-dependent, reduction in the number of dendritic spine density on septal SN56 cholinergic basal forebrain neurons. In this regard, CPF has been reported to induce an alteration in the dendritic spines density in the prefrontal cortex and hip-

poampus after acute and repeated exposure to subclinical doses respectively<sup>18,19</sup>, supporting our results. Dendritic spines loss has been reported in neurodegenerative disorders as AD, affecting mostly selective neuronal networks of critical importance for memory and cognition, such as the basal forebrain cholinergic system, the medial temporal regions, the hippocampus and many neocortical association areas<sup>15</sup> inducing cognitive disorders<sup>16,17</sup>. Moreover, cognitive disorders have been reported to be produced from subclinical doses and from lower doses from which basal forebrain cholinergic cell loss has been reported<sup>20</sup>, as happens with dendritic spines alteration, suggesting that both processes are implicated in cognitive disorders induction, at low doses only through dendritic spine alteration and at higher doses through both mechanisms.

In addition, we observed that after acute (from 0.01  $\mu$ M) and long term (from 0.01  $\mu$ M) CPF exposure, a concentration-dependent downregulation in PSD95 and SYP gene expression was produced. It has been suggested that SYP plays a role in formation and stabilization of synapses<sup>50</sup>, regulating dendritic spine density and shape<sup>51,52</sup>. Moreover, PSD95 was described to play a role in determining the size and the strength of synapses<sup>53,54</sup>, formation of synapse assemblies<sup>54</sup> and spine-maturation<sup>55,56</sup>. Therefore, both genes alteration could be implicated in the effects observed on dendritic spines. Our results show that PSD95 and SYP gene expression is altered below the concentration from which dendritic spine density disruption is evident, which indicates that the harmful effects of CPF exposure on dendritic spines could be started and detected before they would be manifest and these genes could be used as biomarker of this effect. Moreover, PSD95 and SYP are both involved in dendritic spine morphology regulation and their alteration by CPF exposure may be involved with a disruption of dendrite spine shape, contributing to the cognitive disorders observed. Otherwise, we only observed a concentration-dependent SPN and NMDANR1 gene expression downregulation after acute exposure from 1  $\mu$ M CPF concentration and after long-term exposure from 0.1  $\mu$ M CPF concentrations as seen with dendritic spines density reduction, suggesting both genes are directly correlated with this effect. In this regard, SPN, a key cytoskeletal protein in the formation and maintenance of dendritic spines, has been reported to modulate dendritic morphology and number<sup>33</sup> and an increase in dendritic spine density has been correlated with an increase in the spinophilin expression<sup>34</sup>. In addition, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, is also involved in synaptic plasticity as well as learning and memory processes regulation<sup>57</sup> and the N-methyl-D-aspartate receptor antagonists reduce dendritic spine density and neurite growth<sup>35</sup>. Future studies are needed to determine the implication of these genes in dendritic spine shape and density disruption mechanisms.

According to all exposed above, CPF induced changes on cell death and dendritic spines plasticity pathways were detected at doses below those required to induce manifest

apoptotic and necrotic cell death and alter dendritic spines plasticity. These results support the suggestion that gene expression changes could potentially be more sensitive measures of effects at early stages and at lower doses than many typical toxicological measures<sup>58</sup> and that altered toxicogenomic profiles contributing to toxicologically-relevant pathways provide useful tools for more precise determination of toxicological mechanisms as compared to traditional toxicological endpoints and for reducing uncertainty in establishing lowest observed adverse effect level (LOAEL), no observed adverse effect level (NOAEL), or benchmark dose (BMD)<sup>59-62</sup>. Therefore, the toxicogenomic profile analysis could offer means to improve human health risk assessment generally based on standard toxicity test results. Previously, this approach has been employed in different studies as the published by Lobenhofer et al<sup>60</sup> that examines *in vitro* transcriptional responses to very low concentrations of estrogen, confirming that estrogen concentrations below those which are physiologically relevant did not induce a measurable transcriptional response. That concentration threshold was referred to as the No Observable Transcriptional Effect Level (NOTEL). In our study, it was shown that the CPF Lowest Observed Adverse Transcriptional Expression Levels (LOATEL) for 12 responding genes was at least 100-fold lower than the NOAEL that was based on observable inhibition of erythrocyte acetylcholinesterase activity in humans<sup>30</sup>. Therefore, lower doses would be needed in order to observe no transcriptional effects. Examination of data from the group of 12 responding genes leads us to propose 0.003-0.004 mg/kg/day as LOATEL for CPF. The present study did not, therefore, establish a No Observed Adverse Transcriptional Effect Level (NOATEL) for CPF. These subclinical transcriptional changes may be employed as predictors of adverse effects from toxic compounds exposure and thereby used to improve risk assessment and safety evaluation. Further studies are required to confirm this LOATEL.

## Conclusion

Taking all together, it can be concluded that after acute and long-term exposure, CPF induces at low concentration a dendritic spine density reduction and at higher concentrations induces cell death on cholinergic neurons from basal forebrain through apoptotic and necrotic mechanisms, depending on the exposure concentration mediated in part through AChE variants overexpression and these effects were initiated at lower concentration that which they are manifest, as indicated by transcriptional alterations of key genes. Our results, particularly those for CPF treatment, suggest that toxicogenomic profiles provide a sensitive tool for identifying and characterizing thresholds of toxicity for potentially toxic compounds based upon a transcriptome-level of insight into their mechanisms. These effects could explain cognitive alterations and neurodegenerative diseases induced by CPF. In this regard, all the mechanisms that we reported to induce cholinergic cell loss in



basal forebrain have been described to be involved with the induction of cognitive disorders, which supports this hypothesis. Future studies should be developed to determine the other mechanisms implicated in these effects observed on cholinergic neurons. These results are of interest, since they provide new information on the mechanisms that mediate dendritic spine density alteration and cell death induced by CPF, and because they lead to a better understanding of some effects related to CPF toxicity and highlight the need for a new NOAEL and LOAEL and a new risk assessment of this pesticide.

## References

- Richardson JR, and Chambers JE. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on cholinergic neurochemistry in developing rats. *Toxicol Sci.* 2005; 84 (2): 352-9.
- Hernandez CM, Beck WD, Naughton SX, Poddar I, Adam BL, Yanasak N, Middleton, C, and Terry AV Jr. Repeated exposure to chlorpyrifos leads to prolonged impairments of axonal transport in the living rodent brain. *Neurotoxicology.* 2015; 47: 17-26.
- Rohlman DS, Anger WK, and Lein PJ. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology.* 2001; 32(2): 268-76.
- Lopez-Granero C, Cardona D, Gimenez E, Lozano R, Barril J, Sanchez-Santed F, and Canadas F. Chronic dietary exposure to chlorpyrifos causes behavioral impairments, low activity of brain membrane-bound acetylcholinesterase, and increased brain acetylcholinesterase-R mRNA. *Toxicology.* 2013; 308: 41-9.
- Middlemore-Risher ML, Buccafusco JJ, and Terry, AV Jr. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *NeurotoxicolTeratol.* 2010; 32(4): 415-24.
- Moser VC, Phillips PM, McDaniel KL, Marshall RS, Hunter DL, and Padilla S. Neurobehavioral effects of chronic dietary and repeated high-level spike exposure to chlorpyrifos in rats. *ToxicolSci.* 2005; 86 (2): 375-86.
- Samsam TE, Hunter DL, and Bushnell PJ. Effects of chronic dietary and repeated acute exposure to chlorpyrifos on learning and sustained attention in rats. *Toxicol Sci.* 2005; 87(2): 460-8.
- Scheiderer CL, McCutchen E, Thacker EE, Kolasa K, Ward MK, Parsons D, Harrell L. E, Dobrunz LE, and McMahon LL. Sympathetic sprouting drives hippocampal cholinergic reinnervation that prevents loss of a muscarinic receptor-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses. *J Neurosci.* 2006; 26(14): 3745-56.
- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, and Davis KL. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem.* 1995; 64(2): 749-60.
- Andersson H, Petersson-Grawe K, Lindqvist E, Luthman J, Oscarsson A, and Olson L. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *NeurotoxicolTeratol.* 1997; 19: 105-15.
- Del Pino J, Moyano P, Anadon MJ, Garcia JM, Diaz MJ, Garcia J, and Frejo MT. Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration. *Toxicology.* 2015; 336: 1-9.
- Kammon AM, Brar RS, Sodhi S, Banga HS, and Sandhu HS. Neuropathological Studies of Chickens Following Exposure to Chlorpyrifos. *Toxicology International.* 2010; 17, 78-81.
- Nasr HM, El-Demerdash FM, and El-Nagar WA. Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats: Toxicity of insecticide mixture. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23: 1852-9.
- Del Pino J, Zeballos G, Anadon MJ, Capo MA, Diaz MJ, Garcia J, and Frejo MT. Higher sensitivity to cadmium induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons: a cholinesterase dependent mechanism. *Toxicology.* 2014; 325: 151-9.
- Baloyannis SJ. Brain capillaries in Alzheimer's disease. *Hell J Nucl Med.* 2015; 1: 152.
- Hains AB, Yabe Y, and Arnsten AFT. Chronic Stimulation of Alpha-2A-Adrenoceptors With Guanfacine Protects Rodent Prefrontal Cortex Dendritic Spines and Cognition From the Effects of Chronic Stress. *Neurobiology of stress.* 2015; 2: 1-9.
- Mandolesi L, De Bartolo P, Foti F, Gelfo F, Federico F, Leggio MG, and Petrosini L. Environmental enrichment provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion. *J Alzheimers Dis.* 2008; 15: 11-28.
- Oostingh GJ, Wichmann G, Schmittner M, Lehmann I, and Duschl A. The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects. *J Immunotoxicol.* 2009; 6: 136-45.
- Speed HE, Blaiss CA, Kim A, Haws ME, Melvin NR, Jennings M, Eisch AJ, and Powell CM. Delayed reduction of hippocampal synaptic transmission and spines following exposure to repeated subclinical doses of organophosphorus pesticide in adult mice. *Toxicol Sci.* 2012; 125: 196-208.
- Terry AV Jr, Stone JD, Buccafusco JJ, Sickles DW, Sood A, and Prendergast MA. Repeated exposures to subthreshold doses of chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport, and deficits in spatial learning. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305(1): 375-84.
- Hammond DN, Lee, HJ, Tongard JH, and Wainer BH. Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* 1990; 512 (2): 190-200.
- Hudgens ED, Ji L, Carpenter CD, and Petersen SL. The gad2 promoter is a transcriptional target of estrogen receptor (ER) alpha and ER beta: a unifying hypothesis to explain diverse effects of estradiol. *J Neurosci.* 2009; 29(27): 8790-7.
- Bielarczyk H, Jankowska A, Madziar B, Matecki A, Michno A, and Szutowicz A. Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid- $\beta$ -peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem Int.* 2003; 42: 323-31.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Pawelczyk T, and Jankowska-Kulawy A. Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Met Brain Dis.* 2006; 21: 149-61.
- Crumpton TL, Seidler FJ, and Slotkin TA. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos?. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000; 121: 189-95.
- Dam K, Garcia SJ, Seidler FJ, and Slotkin TA. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999; 116 (1): 9-20.

## Conflicts of interest statement

There are no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgments

The authors thank Margarita Lobo, and Maria Jesus Diaz, Professors of Toxicology from Universidad Complutense de Madrid for their throughout review of the present work.

27. Jett DA, and Navoa RV. In vitro and in vivo effects of chlorpyrifos on glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Neurotoxicology*. 2000; 21(1-2): 141-5.
28. Roy TS, Andrews JE, Seidler FJ, and Slotkin TA. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology*. 1998; 58(2), 62-8.
29. Nolan RJ, Rick DL, Freshour NL, and Saunders JH. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984, 73 (1): 8-15.
30. JMPR. Pesticide Residues in Food–1999, Evaluations Part II: Toxicological WHO/PCS/00.4, FAO/WHO Pesticide Residues in Food, No 154, Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1999.
31. Wright CL, and McCarthy MM. Prostaglandin E2-induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A, AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor signaling. *J Neurosci*. 2009; 29: 13274-82.
32. Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
33. Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, and Greengard P. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 9287-92.
34. Hu J, Vidovic M, Chen MM, Lu QY, and Song, ZM. Activation of  $\alpha 2A$  adrenoceptors alters dendritic spine development and the expression of spinophilin in cultured cortical neurones. *Brain Res*. 2008; 1199: 37-45.
35. Zhang Q, Yu Y, and Huang XF. Olanzapine Prevents the PCP-induced Reduction in the Neurite Outgrowth of Prefrontal Cortical Neurons via NRG1. *Sci Rep*. 2016; 6: 19581.
36. Auld DS, Komecook TJ, Bastianetto S, and Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*. 2002; 68: 209-45.
37. Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, and Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci*. 2004; 29(6): 427-41.
38. Kesner RP, Adelstein TB, and Crutcher KA. Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*. 1989; 9: 289-300.
39. Madziar B, Lopez-Coviella I, Zemelko V, and Berse B. Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol-3'-kinase pathway. *J Neurochem*. 2005; 92: 767-79.
40. Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease--interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res*. 2005; 30 (6-7): 895-908.
41. Davies CC, Mason J, Wakelam MJ, Young LS, and Eliopoulos AG. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004; 279 (2): 1010-9.
42. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*. 2004; 16: 139-44.
43. Mahul-Mellier AL, Pazarentzos E, Datler C, Iwasawa R, AbuAli G, Lin B, and Grimm S. De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF. *Cell Death Differ*. 2012; 19 (5): 891-9.
44. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, and Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008; 135 (7): 1311-23.
45. Del Pino J, Frejo MT, Baselga MJ, Capo MA, Moyano P, Garcia JM, and Diaz MJ Neuroprotective or neurotoxic effects of 4-aminopyridine mediated by KChIP1 regulation through adjustment of Kv 4.3 potassium channels expression and GABA-mediated transmission in primary hippocampal cells. *Toxicology*. 2015; 333: 107-17.
46. Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontry HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ Jr, and Harris CC. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (7): 3706-11.
47. Jin S, Tong T, Fan W, Fan F, Antinore MJ, Zhu X, Mazzacurati L, Li X, Petrik KL, Rajasekaran B, Wu M, and Zhan Q.. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene*. 2002; 21 (57): 8696-704.
48. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*. 2012; 19 (1): 67-74.
49. Oltvai ZN, Millman CL, and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74 (4): 609-19.
50. Tarsa L, and Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 1012-6.
51. Glantz LA, Gilmore JH, Hamer RM, Lieberman JA, and Jarskog LF. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience*. 2007; 149: 582-91.
52. Li Q, Deng Z, Zhang Y, Zhou X, Nagerl UV, and Wong ST. A global spatial similarity optimization scheme to track large numbers of dendritic spines in time-lapse confocal microscopy. *IEEE Trans Med Imaging*. 2011; 30: 632-41.
53. Ehrlich I, and Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2004; 24: 916-27.
54. Garner CC, Nash J, and Huganir RL. PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol*. 2000; 10: 274-80.
55. El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, and Brecht DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*. 2000; 290: 1364-8.
56. Nikonenko I, Boda B, Steen S, Knott G, Welker E, and Muller D. PSD-95 promotes synaptogenesis and multi-innervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol*. 2008; 183: 1115-27.
57. Kannagara TS, Bostrom CA, Ratzlaff A, Thompson L, Cater, RM, Gil-Mohapel J, and Christie, BR. Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One*. 2014; 9: e103155.
58. Parfett C, Williams A, Zheng JL, and Zhou G (). Gene batteries and synexpression groups applied in a multivariate statistical approach to dose-response analysis of toxicogenomic data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013; 67: 63-74.
59. Goldberg Z, Schwietert CW, Lehnert B, Stern R, and Nami I. Effects of low-dose ionizing radiation on gene expression in human skin biopsies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58: 567-74.
60. Lobenhofer EK, Cui X, Bennett L, Cable PL, Merrick BA, Churchill GA, and Afshari CA. Exploration of low-dose estrogen effects: identification of No Observed Transcriptional Effect Level (NOTEL). *Toxicol Pathol*. 2004; 32: 482-92.
61. Schlecht C, Klammer H, Wuttke W, and Jarry H. A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary and uterus of female rats. *Arch Toxicol*. 2006; 80: 656-61.
62. Zheng JL, Parfett C, Williams A, Yagminas A, Zhou G, Douglas GR, and Yaouk CL. Assessment of subclinical, toxicant-induced hepatic gene expression profiles after low-dose, short-term exposures in mice. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011; 60: 54-72.

## REVISIÓ

# Toxicidad medioambiental. Regulación legislativa y repercusiones en salud

*Environmental toxicity. Legislative regulation and health impact*

**Luisa Capdevila García<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Victoria Ramírez Iñiguez de la Torre<sup>1</sup>,  
J. Ignacio Torres Alberich<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Terradillos García<sup>1</sup>**

1. Médico del Trabajo. Grupo de Investigación en Medicina del Trabajo (GIMT)

2. Abogado. Grupo de Investigación en Medicina del Trabajo (GIMT)

---

**Correspondencia**

Luisa Capdevila García  
Servicio de Prevención MAPFRE. Valencia  
E-mail: luicapdevila@gmail.com

**Recibido:** 4 – I – 2016

**Aceptado:** 22 – III – 2016

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.31.01.35

## Resumen

Salud y medioambiente están íntimamente relacionados, y conseguir garantías de seguridad y salud involucra al sistema político, académico, sanitario y social de los países, compitiendo al estado, sus instituciones, universidad, profesionales de la salud y población general.

Destacan las sustancias neurotóxicas, con afinidad por el tejido nervioso, que ocasionan alteraciones funcionales con cambios de la conducta, disturbios de los procesos psicológicos o de la personalidad. Sus efectos varían según sea aguda o crónica la exposición y de su intensidad y duración.

La exposición en épocas perinatales a químicos ambientales, puede ocasionar cambios celulares o moleculares, con repercusión de déficits neuroconductuales o susceptibilidad aumentada a enfermedades neurodegenerativas en etapas posteriores de la vida.

Es necesario incrementar la formación e investigación en esta materia con mayor participación de la Medicina del Trabajo, de Salud Laboral, Pública y Medioambiental como partes esenciales en cualquier planteamiento preventivo.

**Palabras Clave:** toxicidad medioambiental, neurotoxicidad, neurodesarrollo, salud laboral

## Abstract

Health and Environment are closely related and get security guarantees in health involves the political, academic, health and social systems of the countries competing to the state, its institutions, college, health professionals and the general population.

Stand neurotoxic substances with affinity for nerve tissue, causing behaviour changes, disturbances of psychological processes or personality impaired functions. Its effects vary according to acute or chronic exposure and its intensity and duration.

The environmental chemicals exposure, in perinatal time can cause cellular or molecular changes with impact of neurobehavioral deficits, or increased to neurodegenerative diseases in later life stages.

We need to increase training and research in this field and greater participation of Occupational Medicine, Occupational Health, Public and Environmental as essential parts in any preventive approach.

**Keywords:** environmental toxicity, neurotoxicity, neurodevelopment, occupational health

## Introducción

La salud y el medio que nos rodea están íntimamente relacionados. El aire, el agua, el entorno laboral o el interior de los edificios tienen una gran repercusión en nuestro bienestar y salud. Por ese motivo, la calidad y la salubridad del entorno son esenciales para conseguir garantías de seguridad y salud.

Trabajar sobre la Salud ambiental es un desafío que involucra al sistema político, académico, sanitario y social de los países. Es por ello competencia del Estado y sus instituciones, de la Universidad, de los profesionales de los equipos de salud, con sus tareas asistenciales y preventivas, y de cada uno de los ciudadanos, a través del conocimiento y responsabilidad individual.

En los últimos años, se observa una creciente inquietud ante las posibles implicaciones sanitarias derivadas del contacto con el agua o los alimentos con sustancias potencialmente tóxicas y con radiaciones procedentes de la emisión de antenas y dispositivos de telefonía móvil, etc.

La política medioambiental de la Unión Europea (UE) se ha venido guiando desde sus inicios por consideraciones de orden fundamentalmente sanitario. Quedan aún por resolver muchos problemas de medio ambiente y salud, especialmente la dificultad que plantea el establecer un vínculo causal entre determinados factores medioambientales y los efectos perjudiciales para la salud, y el estudio de las consecuencias sanitarias derivadas de la exposición crónica a algunas sustancias tóxicas.

Durante mucho tiempo, las evaluaciones ambientales y las medidas políticas de la UE se han centrado en contaminantes concretos de ámbitos medioambientales específicos (la atmósfera, el agua, el suelo, etc.), subestimando las repercusiones sanitarias porque, en la práctica, los contaminantes se desplazan de un ámbito medioambiental a otro (de la atmósfera al suelo, al agua, etc.) y las personas están expuestas a un conjunto de contaminantes que interactúan con el medio ambiente y con el organismo humano.

## Aspectos legislativos

Los estados y la Unión Europea han desarrollado la Estrategia Europea de Medio Ambiente y Salud<sup>1</sup> (iniciativa SCALE) que proporciona un marco de garantía para la protección de la sociedad en su conjunto. Su objetivo es reducir en Europa las enfermedades provocadas por los factores ambientales, con especial énfasis en los niños. Esta estrategia desarrolló su primer ciclo a través del Plan de Acción de Medio Ambiente y Salud (2004-2010) seleccionando como prioritarias las enfermedades respiratorias, los trastornos del desarrollo neurológico, el cáncer y las alteraciones endocrinas. Nace con el objetivo de de-

sarrollar un sistema comunitario que integre toda la información sobre medio ambiente, ecosistema y salud humana, facilitando la evaluación del impacto medioambiental global sobre la salud tomando en consideración todos los efectos sobre la misma, tales como el efecto "cóctel", la exposición combinada, los efectos acumulativos, etc.

En España, es la Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, integrada en la Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, quien realiza acciones de vigilancia, control, actualización y defensa de la salud ante las agresiones de origen medioambiental. Otras de sus labores fundamentales son la vigilancia legislativa, seguimiento de acuerdos internacionales y la participación en organismos internacionales (Unión Europea, Organización Mundial de la Salud etc.).

Una relación exhaustiva de la legislación de referencia en toxicidad medioambiental y ocupacional Nacional e Internacional se muestra en la **Tabla I**.

## Efectos Neurotóxicos por exposición ocupacional

De la revisión efectuada se concluye que actualmente hay identificados 1.300 neurotóxicos. La legislación Española recoge en el RD Real Decreto 363/1995<sup>2</sup> la Notificación, Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias Peligrosas y en el R.D. 1299/2006<sup>3</sup>, de Enfermedades Profesionales, se contemplan buena parte de los mismos y a ellos se unen referencias recientes, como las referidas al efecto neurotóxico de nanopartículas de tamaño mayor de 100 nm y cuyo efecto neurodegenerativo se añadiría al ya estudiado respiratorio<sup>4</sup>.

Sin embargo, se calcula que hay más de 100.000 sustancias químicas comercializadas circulando por el mercado europeo, para muchas de las cuales no se han estudiado los posibles riesgos para la salud.

Las manifestaciones clínicas por neurotoxicidad pueden englobarse en diferentes cuadros clínicos: Encefalopatías Tóxicas, Síndrome Cerebeloso Tóxico, Síndrome Parkinsoniano de Origen Tóxico y Neuropatías Periféricas Tóxicas<sup>5</sup>.

Datos procedentes de la Encuesta Nacional de Condiciones de trabajo de 2011<sup>6</sup>, muestran que el 14,9% de los trabajadores manifestó que en su puesto de trabajo manipulan sustancias o productos nocivos o tóxicos. El sector Agrario continúa presentando el mayor porcentaje de trabajadores expuestos (23,3%), seguido por la Industria (20,2%), Construcción (19,0%) y Servicios (13,0%).

Según estos datos del Observatorio Estatal de Condiciones de Trabajo, distinguiendo por ramas de actividad, destacan en la manipulación de sustancias o productos

Tabla I: Recopilación legislativa en toxicidad medioambiental y ocupacional

<p>R.D. 363/1995, de 10 de marzo, Reglamento de Notificación de Sustancias Nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias Peligrosas. Modificado por: Orden 13 de septiembre de 1995, por la que se modifica el Anexo I del Reglamento aprobado por R.D. 363/1995.</p> <p>Orden de 21 de febrero de 1997, por la que se modifica el Anexo I del Reglamento aprobado por R.D. 363/1995.</p> <p>R.D. 700/1998, de 24 de abril, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.</p> <p>Orden de 30 de junio de 1998, por la que se modifican los anexos I, II, V y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.</p> <p>Orden de 11 de septiembre de 1998, por la que se modifican los anexos I y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.</p> <p>Orden de 8 de enero de 1999, por la que se modifica la clasificación del hexafluorosilicato de magnesio.</p> <p>Orden 16 de julio de 1999, por la que se modifican los Anexos I y V del Reglamento aprobado por R.D. 363/1995.</p> <p>Orden de 5 de octubre de 2000, por la que se modifican los anexos I, III, IV y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.</p> <p>Orden de 5 de abril de 2001, por la que se modifican los anexos I, IV, V, VI y IX del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.</p> <p>R.D. 507/2001, de 11 de mayo, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.</p> <p>Orden PRE 2317/2002, de 16 de septiembre, que modifican los Anexos I, V, VII A y VIII y sustituye los Anexos II, III, IV y VI.</p> <p>R.D. 99/2003, de 24 de enero, que modifica el Reglamento de Sustancias Peligrosas, aprobado por R.D. 363/1995 de 10 de marzo.</p> <p>Directiva 2004/73/CE, de 29 de abril, por la que se adapta, por vigésima novena vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas.</p> <p>R.D. 255/2003, de 28 de febrero, por el que se aprueba Reglamento de Clasificación, Envasado y Etiquetado de Preparados Peligrosos.</p> <p>Directiva 2006/8/CE, de 23 de enero, por la que se modifican, para su adaptación al progreso técnico, los anexos II, III y V de la Directiva 1999/45/CE, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros relativas a la clasificación, el envasado y el etiquetado de preparados peligrosos.</p> <p>R.D. 1054 /2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de Evaluación para el Registro, Autorización y Comercialización de Biotocidas.</p> <p>R.D. 2549/1994, de 29 de diciembre, que modifica la Instrucción Técnica Complementaria MIE-AP3 del Reglamento de aparatos a presión, referente a generadores de aerosoles.</p> <p>R.D. 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. Modificado por:</p> <p>Orden del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 11 de diciembre de 1990, que modifica el Anexo I del R.D. 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 14.12.1990).</p> <p>Orden del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno de 31 de agosto de 1992, que modifica el Anexo I del R.D. 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 10.9.1992).</p> <p>Orden del Ministerio de la Presidencia de 30 de diciembre de 1993, que modifica el Anexo I del R.D. 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 5.1.1994).</p> <p>Orden del Ministerio de la Presidencia de 14 de mayo de 1998, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 21.5.1998).</p> <p>Orden del Ministerio de la Presidencia de 15 de julio 1998, por la que se modifica Anexo I del Real Decreto 1406/89, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 21.7.1998).</p> <p>Orden de 15 de diciembre 1998, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 22.12.1998).</p> <p>Orden de 11 de febrero de 2000, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la</p>	<p>comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (níquel y sus compuestos) (BOE de 16.12.2000).</p> <p>Orden de 24 de marzo de 2000, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (compuestos organoestánicos y pentaclorofenol) (BOE de 30.03.2000).</p> <p>Orden de 6 de julio de 2000, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 11.07.2000).</p> <p>Orden de 25 de octubre de 2000, por la que se modifica el anexo 1 del Real Decreto 45/1996, de 19 de enero, por el que se regulan diversos aspectos relacionados con las pilas y los acumuladores que contengan determinadas materias peligrosas, y el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (Pilas y acumuladores) (BOE de 27.10.2000).</p> <p>Orden del Ministerio de la Presidencia, de 7 de diciembre de 2001, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (fibras de amianto) (BOE de 14.12.2001).</p> <p>Orden PRE/1624/2002, de 25 de junio, por la que se modifica la parte 2 del anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (BOE de 29.06.2002).</p> <p>Orden PRE/2666/2002, de 25 de octubre, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (creosota y hexacloroetano) (BOE de 31.10.2002).</p> <p>Orden PRE/375/2003, de 24 de febrero, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (compuestos organoestánicos) (BOE de 25.2.2003).</p> <p>Orden PRE/730/2003, de 25 de marzo, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (parafinas cloradas de cadena corta y colorantes azoicos) (BOE de 2.4.2003).</p> <p>Orden PRE/2277/2003, de 4 de agosto, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (arsénico y colorante azul) (BOE de 9.8.2003).</p> <p>Orden PRE/473/2004, de 25 de febrero, que modifica el Anexo I del R.D. 1406/1989, que impone limitaciones de comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados (éter de pentabromo difenilo, éter de octabromo difenilo) (BOE de 27.2.2004).</p> <p>Orden PRE/1895/2004, de 17 de junio, que modifica la parte 2 del Anexo I del R.D. 1406/1989, que impone limitaciones de comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados (sustancias clasificadas como carcinógenas, mutágenas y tóxicas para la reproducción) (BOE 19.6.2004).</p> <p>Orden PRE/1954/2004, de 22 de junio, que modifica el Anexo I del R.D. 1406/1989, que impone limitaciones de comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol y cemento) (BOE 24.6.2004).</p> <p>Orden PRE/3159/2004, de 28 de septiembre, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (métodos de ensayo de colorantes azoicos) (BOE de 5.10.2004).</p> <p>Orden PRE/556/2005, de 10 de marzo, por la que se modifica la Orden PRE/473/2004, de 25 de febrero, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo, éter de octabromodifenilo) (BOE de 11.3.2005).</p> <p>Orden PRE/1933/2005, de 17 de junio, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (dispositivos de perforación) (BOE de 23.6.2005)</p> <p>Directiva 2005/59/CE, de 26 de octubre, por la que se modifica por vigesimotava vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (tolueno y triclorobenceno).</p> <p>Reglamento (CEE) núm. 793/1993, de 23 marzo. Evaluación y control del riesgo de las sustancias existentes.</p> <p>Reglamento (CE) núm. 1.179/1994, de 25 mayo, relativo a la primera lista de sustancias prioritarias prevista en el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo.</p> <p>Reglamento (CE) núm. 2.268/1995, de 25 septiembre, relativo a la segunda lista de sustancias prioritarias prevista en el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo.</p> <p>Reglamento (CE) núm. 143/1997, de 25 enero, relativo a la tercera lista de sustancias prioritarias prevista en el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo.</p> <p>Reglamento (CE) núm. 2.364/2000, de 25 octubre, relativo a la cuarta lista de sustancias prioritarias prevista en el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo.</p>
---	---

Tabla II: Neurotóxicos laborales

Sustancia neurotóxica	Fuente de exposición	Cuadro clínico
<b>METALES</b>		
<b>Arsénico</b>	Pesticidas Pigmentos Industria electroplatinada Semiconductores	Encefalopatía aguda Neuropatía periférica
<b>Plomo</b>	Soldadores Insecticidas Pinturas	Encefalopatía Encefalopatía y Neuropatía periférica
<b>Manganeso</b>	Soldadura Fertilizantes Fabricación de baterías secas	Encefalopatía Parkinsonismo
<b>Mercurio</b>	Instrumentos científicos Equipos eléctricos Amalgamas dentales Industria electroplatinada Fotografía	<i>Agudo:</i> cefaleas, náuseas, temblores <i>Crónico:</i> ataxia, neuropatía periférica y encefalopatía
<b>Cobre</b>	Soldaduras Componentes electrónicos Plásticos polivinílicos Fungicidas	<i>Agudo:</i> defectos de memoria, convulsiones, desorientación <i>Crónico:</i> encefalomielopatía
<b>DISOLVENTES</b>		
<b>Sulfuro de Carbono</b>	Fabricación de rayón de viscosa Fabricación acelerantes caucho Fabricación herbicidas	<i>Agudo:</i> encefalopatía <i>Crónico:</i> neuropatía periférica
<b>N- hexano</b>	Pinturas Industria del calzado	Narcosis Neuropatía periférica
<b>N-butil-cetona</b>	Lacas Barnices Decapantes de pinturas Colas y adhesivos	Narcosis Neuropatía periférica
<b>Percloroetileno</b>	Decapantes de pinturas Desengrasantes, Agentes extractores, Industria textil	<i>Agudo:</i> narcosis <i>Crónico:</i> neuropatía periférica, Encefalopatía
<b>Tolueno</b>	Agentes limpiadores, Colas Manufactura del benceno Gasolina, Pinturas	<i>Agudo:</i> narcosis <i>Crónico:</i> encefalopatía, ataxia
<b>Tricloroetileno</b>	Desgrasantes Industria de la pintura Barnices, Industria del lavado en seco	<i>Agudo:</i> narcosis <i>Crónico:</i> encefalopatía, neuropatía Craneal
<b>PLAGUICIDAS</b>		
<b>Órgano-fosforados</b>	Agricultura Manufactura y aplicación	<i>Agudo:</i> envenenamiento colinérgico <i>Crónico:</i> ataxia, parálisis, neuropatía periférica
<b>Carbamatos</b>	Agricultura Manufactura y aplicación	<i>Aguda:</i> síndrome colinérgico <i>Crónico:</i> temblor y neuropatía Periférica
<b>Bromuro de Metilo</b>		Polineuropatía periférica
<b>GASES</b>		
<b>Monóxido de Carbono</b>	Combustión incompleta de materiales orgánicos como gasolina, gases (metano y propano)	<i>Agudo:</i> cefalea, mareo, náusea, alteración en funciones cognitivas, pérdida de conciencia <i>Crónico:</i> Parkinsonismo, tras un período de pseudorecuperación
<b>Óxido de Etileno</b>	Esterilización en unidades Hospitalarias Industria de equipos médicos	<i>Aguda:</i> irritación del tracto respiratorio, náusea, cefalea, vértigo <i>Crónica:</i> neuropatía periférica

Fuente: Lezaun Goñi M, Machín Azparren M, (2008).

**Tabla III:** Enfermedades del sistema nervioso central y periférico con relación laboral

	CAUSADAS POR EL TRABAJO	AGRAVADAS POR EL TRABAJO
Enfermedades agudas del Sistema Nervioso Central	9	3
Trastornos localizados de los Nervios	345	80
Neuropatías y Polineuropatías	4	1
<b>TOTAL</b>	<b>358</b>	<b>84</b>

Fuente: Patologías laborales no traumáticas. Observatorio de Enfermedades Profesionales y de enfermedades causadas o agravadas por el trabajo. Informe anual 2013.

nocivos o tóxicos por parte de los trabajadores, las actividades sanitarias, veterinarias y servicios sociales (con un 28,2%) y la industria química, de saneamiento y extractiva (27,6% de trabajadores)<sup>7</sup>.

De acuerdo con la Agencia Europea de Seguridad y Salud en el Trabajo, el 19% de los trabajadores de la Unión Europea declara estar expuestos a vapores tóxicos durante una cuarta parte o más de su horario laboral, mientras que el 15% de los trabajadores tiene que manipular sustancias peligrosas como parte de su trabajo cotidiano<sup>8</sup>.

Los principales neurotóxicos, sus fuentes de exposición y los efectos clínicos asociados, ordenados en 4 grandes grupos según las características químicas de cada una de las sustancias se muestran en la **tabla II**.

Los resultados del informe anual del Observatorio de Enfermedades Profesionales y de enfermedades causadas o agravadas por el trabajo referido a 2013, recogidas en el PANOTRATSS (patologías no traumáticas), se muestran en la **tabla III**.

En la **tabla IV** se muestran los principales cuadros tóxicos por exposición ambiental u ocupacional.

## Neurotoxicidad Ambiental y Neurodesarrollo

Tal y como se ha visto previamente, se ha trabajado en los efectos tóxicos por exposición ocupacional y por exposición medioambiental a sustancias como plaguicidas, metales o fármacos, pero existe un desconocimiento notorio respecto a las exposiciones tóxicas que se asocian con alteraciones del neurodesarrollo<sup>9, 10</sup>.

Se calcula que aproximadamente un 3% de los trastornos del neurodesarrollo son el resultado directo de la exposición ambiental a distintos compuestos químicos y que otro 25% se originan a través de interacciones entre

factores ambientales y factores de susceptibilidad genética individual<sup>11</sup>.

Las afecciones más comunes del neurodesarrollo, como el autismo, retardo mental, hiperactividad y dislexia, ocurren en aproximadamente 3-8% de los recién nacidos de Estados Unidos<sup>12</sup>, registrándose un aumento de la prevalencia de estos cuadros en situaciones de mayor exposición a distintos agentes neurotóxicos.

La exposición en épocas perinatales a distintos químicos ambientales, puede ocasionar cambios a nivel celular o molecular, que se expresan como déficit funcionales en la esfera neuroconductual<sup>13</sup>, u ocasionan una susceptibilidad aumentada a enfermedades neurodegenerativas en etapas posteriores de la vida<sup>14</sup>.

Las principales sustancias relacionadas con afectación en desarrollo neuronal y los efectos más frecuentes por toxicidad medioambiental se muestran en la **tabla IV**.

## Discusión

En el momento actual, aunque persisten muchas lagunas en el conocimiento, es sabido que un gran número de sustancias de amplio uso industrial producen severos efectos negativos sobre la salud de los individuos.

Por su peculiar agresividad destacan las llamadas sustancias neurotóxicas, entendiendo como tales aquellas que tienen una especial afinidad por el tejido nervioso y que ocasionan alteraciones funcionales en este sistema, que se traducen de forma más o menos directa en cambios de la conducta, y/o en disturbios de los procesos psicológicos y de la personalidad. Sus efectos varían según la exposición ambiental sea de carácter agudo o crónico y en función de su intensidad y duración.

Se ha comprobado que los límites higiénico-sanitarios no son todo lo seguros que se desearía y están muy alejados de garantizar una "no agresión" a la salud del trabajador, por lo que se impone la necesidad de considerar un enfoque preventivo para evitar que las manifestaciones del llamado "daño temprano" se conviertan en lesiones irreversibles en cuanto a la funcionalidad y estructura del sistema nervioso. Por ello, se requiere de un mayor desarrollo en medios diagnósticos capaces de detectar, con una alta sensibilidad las llamadas alteraciones tempranas, generalmente no consideradas en el campo de la clínica médica tradicional.

Dentro de los agentes neurotóxicos más conocidos, el problema de los plaguicidas se ve superado en la actualidad con el incremento del uso de los solventes orgánicos en una gran cantidad de procesos relacionados con la producción de bienes de consumo, como ropas, pieles artificiales, zapatos y utensilios de todo tipo y te-

Tabla IV: Principales cuadros tóxicos por exposición ambiental u ocupacional

<b>Enfermedades por exposición a disolventes</b>	Encefalopatías tóxicas crónicas Síndrome narcótico por tolueno o N- hexano Neuropatía por N- Hexano: Enfermedades por exposición a pesticidas organofosforados	
<b>Enfermedades por exposición a metales</b>	Plomo: Encefalopatía saturnina crónica, Neuropatía periférica motora, Encefalopatía tóxica aguda por plomo Mercurio: neuropatía,	
<b>Enfermedades por exposición a gases</b>	Intoxicación aguda por monóxido de carbono	
<b>Fármacos con efecto neurotóxico*</b>	Principios usados para el corazón o la presión arterial	Amiodarona, Hidralazina, Perhexilina
	Principios usados para combatir el cáncer:	Cisplatino, Docetaxel, Paclitaxel, Surramin, Vincristina, Doxorubicina, Missoniazida, Taxol
	Principios usados empleados en el tratamiento de infecciones	Cloroquina, Isoniazida, Metronidazol, Nitrofurantoína, Talidomida, Cloranfenicol, Estreptomina
	Principios empleados en enfermedades autoinmunes	Etanercept, Infliximab, Leflunomida
	Principios para combatir el VIH	Didanosina, Estavudina, Zalcitabina
	Principios usados en enfermedades de la piel	Dapsona, Piridinetiona
	Principios empleados como anticonvulsivos:	Fenitoína (difenilhidantoina)
	Medicamentos antialcohólicos	Disulfiram
	Principios usados en el tratamiento de enfermedades reumáticas	Colchicina, Oro
	Principios usados en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas	Litio
	Principios usados como antiparasitarios	Piretrina, Kainato

Fuente: Medline plus; Regidor et al, 1998.

niendo en cuenta que se considera a este tipo de agentes neurotóxicos como unos de los más agresivos para el sistema nervioso por sus propiedades lipotróficas y otras propiedades físico-químicas. En el caso del plomo, baste señalar su influencia en la industria automotriz, en la fabricación de baterías, entre otros múltiples usos.

Cuando se plantea una valoración de las alteraciones del desarrollo neurológico en relación con el medio ambiente, se observa que las enfermedades relacionadas con efectos de sustancias químicas sobre el sistema nervioso presentan variaciones en función de la edad de la persona expuesta al agente. Así, los efectos observados durante el desarrollo neuronal son diferentes cualitativa y cuantitativamente con las exposiciones en adultos, ya que la secuencia crítica de sucesos cerebrales constituye un elemento de vulnerabilidad que se extiende desde la etapa precoz fetal hasta la adolescencia.

Los factores ambientales y especialmente la exposición a sustancias químicas neurotóxicas o que afectan al desarrollo neurobiológico, son un riesgo bien reconocido en la mayoría de casos, pero no obstante, con un insuficiente estudio acerca de su mecanismo de neuro-

toxicidad y los efectos sobre desarrollo neurobiológico. Muchas sustancias químicas pueden alterar el desarrollo y funciones del sistema nervioso de manera específica y de forma permanente, pero solo unas pocas han sido ampliamente investigadas en sus efectos, mecanismos de toxicidad y su comportamiento epidemiológico, ejemplo de ellas son: plomo, mercurio, algunos plaguicidas y algunos disolventes.

De los resultados de esta revisión se deriva la necesidad de actuar en prevención con implicación tanto de las empresas como de las Administraciones Públicas y Entidades afectadas.

Resulta evidente la necesidad de incrementar los aspectos de investigación en esta materia con una mayor participación de la Medicina del Trabajo y de la Salud Laboral y Medioambiental como partes esenciales en cualquier planteamiento preventivo a desarrollar y la imprescindible colaboración con técnicos de prevención y sanitarios de las especialidades médico-asistenciales implicadas.

Las actuaciones preventivas abarcan tanto el control de los factores de riesgo, especialmente en los sectores



**Tabla V:** Sustancias y efectos más frecuentes en neurodesarrollo por tóxicos

PRINCIPALES SUSTANCIAS	PRINCIPALES EFECTOS
Metilmercurio	Efectos neuroconductuales <sup>15</sup> , parálisis cerebral, convulsiones, ceguera, sordera, alteraciones del lenguaje, atención y memoria <sup>16</sup>
Plomo	Efectos neuroconductuales, encefalopatía, coma y disminución del rendimiento académico (alteraciones de memoria, concentración, coordinación, motricidad, hiperactividad...) <sup>17,18,19</sup>
PCBs	Retraso en desarrollo psicomotor, hiperactividad y bajo cociente intelectual <sup>20</sup> , déficit de expresión verbal, concentración y lectura comprensiva <sup>21</sup> , déficit en procesos cognitivos básicos <sup>22</sup>
Etanol	Síndrome alcohólico fetal, retardo mental <sup>23</sup> , afectación del lenguaje, capacidad de abstracción, atención y comportamiento <sup>24</sup>
Pesticidas	Alteraciones de la memoria, coordinación óculomanual <sup>25</sup> y coordinación y respuesta motora <sup>26</sup> . Trastornos del espectro autista <sup>27</sup>
Arsénico	Afectación neurocognitiva y disminución del cociente intelectual <sup>28</sup>
Otros químicos: manganeso, fluor, perclorato y solventes	Alteraciones del neurodesarrollo en distinto grado <sup>29</sup>

profesionales o colectivos más afectados, como actuando entre los profesionales de la salud fomentando la investigación básica, clínica, monitorización ambiental con muestras no invasivas y epidemiológica.

Interesa potenciar la formación y docencia para lograr la capacitación de profesionales en aras de una adecuada detección y manejo de los problemas de salud medioambiental relacionada con exposición a neurotóxicos. Esto

redundará también en una mejora asistencial facilitando la detección y diagnóstico de enfermedades relacionadas con exposición ambiental a sustancias químicas.

Finalmente, un mejor conocimiento permitirá la participación activa de la sociedad en su conjunto, requiriéndose para ello de programas que incrementen actividades formativas y fomentar la sensibilización de la población acerca la relación del binomio salud y medioambiente.

## Bibliografía

- Observatorio de Salud y Cambio Climático, Estrategia Europea de Salud Ambiental: Iniciativa "SCALE". Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Consultado el 1 de febrero de 2016. Disponible en: [[http://www.oscc.gob.es/es/general/salud\\_cambio\\_climatico/iniciativa\\_scale\\_es.htm](http://www.oscc.gob.es/es/general/salud_cambio_climatico/iniciativa_scale_es.htm)].
- Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Ministerio de la Presidencia. BOE núm. 133, de 5 de junio de 1995, p.16544-7.
- Real Decreto 1299/2006, de 10 de noviembre, por el que se aprueba el cuadro de enfermedades profesionales en el sistema de la Seguridad Social y se establecen criterios para su notificación y registro. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. BOE» núm. 302, de 19 de diciembre de 2006, p.44487-546.
- Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. Nanoparticles and the brain: cause for concern? *J Nanosci Nanotechnol*. 2009 Aug;9(8):4996-5007.
- Vicente-Herrero MT, Ramirez Iñiguez de la Torre MV, Capdevila García L, Terradillos García MJ, López González AA. Grupo de Investigación en Medicina del Trabajo. Neurotoxicidad y Trabajo. Revisión Jurisprudencial. Disponible en: [<https://www.facebook.com/GIMT-568117683277334/>]. Consultado el 10 de febrero de 2016.
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. VI Encuesta Nacional de Condiciones de Trabajo. Ministerio de Empleo y Seguridad Social. Disponible en: [<http://www.insht.es>]. Consultado el 1 de febrero de 2016.
- Agencia europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo. El Estado de la Seguridad y la Salud en el Trabajo en la Unión Europea. Estudio piloto. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, 2000. Consultado el 14 de junio de 2014. [Disponible en: <https://osha.europa.eu>].
- Agency methods for identification of hazards to developing organisms, Part II: The developmental toxicity testing guideline. *Am J Ind Med*. 1999;35:554-63
- Claudio L, Kwa WC, Russell AL, Wallinga D. Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;164:1-14.
- National Research Council. Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment. Washington DC: National Academies Press; 2000.
- Newschaffer CJ, Falb MD, Gurney JG. National autism prevalence trends from United States special education. *Pediatrics*. 2005; 115(3):e277-82.

12. Adams J, Barone S Jr, LaMantia A, Philen R, Rice DC, Spear L, Susser E. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: Neurobehavioral work group summary. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 3): 535-44.
13. Cory-Slechta DA, Thiruchelvam MT, Richfield EK, Barlow BK, Brooks AI (2005) Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73:136-9.
14. Davidson PW, Myers GJ, Weiss B. Mercury exposure and child development outcomes. *Paediatrics.* 2004;113(Suppl 4): 1023-9.
15. Harata M. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol.* 1995; 25 : 1-24.
16. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to Methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 1997;19(6):417-28.
17. Needleman HL, Bellinger D. The health effects of low level exposure to Lead. *Annu Rev Public Health.* 1991;12:111-40.
18. Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: A longterm follow-up study. *Pediatrics.* 1992;90:855-61.
19. Lanphear BP. Cognitive deficits associated with blood Lead concentrations <10 microg/dLin US children and adolescents. *Public Health Rep.* nov 2000; 115(6): 521-9.
20. Guo YL, Lambert GH, Chen-Chin H, Hsu M. Yucheng: Health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int Arch Occup Environ Health.* Apr 2004;77(3): 153-8.
21. Jacobson JL, Jacobson SW. Association of Prenatal Exposure to an Environmental Contaminant with Intellectual Function in Childhood. *J Toxicol Clin Toxicol.* Aug 2002;40(4):467-75.
22. Vreugdenhil HJ, Mulder PG, Emmen HH, Weisglas-Kuperus N. Effects of perinatal exposure to PCBs on neuropsychological functions in the Rotterdam cohort at 9 years of age. *Neuropsychology.* Jan 2004;18(1):185-93.
23. Mukherjee RA, Hollins S, Abou-Saleh MT, Turk J. Low level alcohol consumption and the fetus. *BMJ.* 2005;330 :375 -6.
24. Claudio L, Bearer CF, Wallinga D. Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, Part II: The developmental toxicity testing guideline. *Am J Ind Med.* 1999;35(6):554-63.
25. Jacobson SW, Chiodo LM, Sokol RJ, Jacobson JL. Validity of maternal report of prenatal alcohol, cocaine, and smoking in relation to neurobehavioral outcome. *Pediatrics.* 2002;109:815-25.
26. Guillette EA, Meza MM, Aquilar MG, Soto AD, Garcia IE. An Anthropological Approach to the Evaluation of Preschool Children Exposed to Pesticides in Mexico. *Environ Health Perspect.* Jun 1998; 106(6):347-53.
27. Rohlman DS, Arcury TA, Quandt SA, Lasarev M, Rothlein J, Rachelle T. Neurobehavioral performance in preschool children from agricultural and non-agricultural communities in Oregon and North Carolina. *NeuroToxicology.* 2005; 26(4): 589-98.
28. Roberts EM, English PB, Grether JK, Windham GC, Somberg L, Wolff C. Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environ Health Perspect.* 2007;115(10): 1482-9.
29. Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Kline J et al. Water Arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Arahazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect.* 2007 Feb;115(2):285-9

## ESTUDI DE CASOS

# Hipercalcèmia per hiperparatiroidisme primari

*Hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism*

**Emili Navalón Ramon**

Centre de Salut Ontinyent-II. València

**Correspondència**

Emili Navalón Ramon  
Sor Isabel de Villena, 29  
46819-NOVETLÈ (València)  
Tel.: 677 421 986 Fax: 96 291 94 51  
E-mail: emilinavalon@gmail.com

**Recibido:** 28 – I – 2016

**Aceptado:** 21 – III – 2016

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.31.01.43

## Resum

Es presenta el cas clínic d'un home de 58 anys amb l'antecedent de cirrosi hepàtica d'etiologia alcohòlica que presenta un quadre confusional agut atribuïble en principi a una descompensació de la seua hepatopatia, però en el qual quan es descarten altres possibles causes de la seua clínica, es descobreix un nou diagnòstic d'hipercalcèmia per hiperparatiroidisme primari, el que demostra com el clínic no ha d'acceptar d'immediat una explicació que sembla manifesta. L'hiperparatiroidisme primari és la causa més freqüent d'hipercalcèmia en pacients ambulatoris.

**Paraules clau:** hipercalcèmia, hiperparatiroidisme primari, cirrosi hepàtica

## Abstract

We present a case of a 58 year-old man with a history of alcoholic liver cirrhosis who presents an acute confuse state which is attributed to a decompensation of their liver. We discover a new diagnosis of hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism when we are discarding other possible causes of this syndrome, which demonstrates how the clinician must not accept an explanation that seems immediately evident. The primary hyperparathyroidism is the most common cause of hypercalcemia in outpatients.

**Keywords:** hypercalcemia, primary hyperparathyroidism, liver cirrhosis

## Introducció

El quadre clínic que ens ocupa es tracta d'un episodi confusional agut atribuïble en principi a una descompensació de l'hepatopatia crònica del pacient, però que obliga a descartar-ne altres causes i evitar així el tancament prematur del diagnòstic.

## Cas clínic

El pacient referit en aquest cas és un home de 58 anys que consulta per un deteriorament progressiu de l'estat general, junt amb nàusees, vòmits, dificultat per a la marxa i per a la ingesta i confusió. Entre els seus antecedents personals s'ha de destacar una cirrosi hepàtica d'etiologia alcohòlica amb múltiples descompensacions —tant icterohidròpiques com encefalopàtiques— que l'han obligat a diversos ingressos hospitalaris, així com hipertensió arterial (HTA). Segueix tractament amb espirolactona (100 mg cada 12 h), furosemida (40 mg cada 24 h), verapamil/trandolapril (180/2 mg cada 24 h), vitamina B1/B6/B12

(250/250/0.5 mg cada 12 h), lactitol (10 g cada 12 h) y clometiazole (192 mg cada 24 h). En l'exploració el pacient apareix afebril, conscient i bradipsíquic. Presenta estigmes cutanis d'hepatopatia crònica i lesions per gratada. No existeix ascites valorable. Hi ha *flapping* i edemes amb fòvea en els membres inferiors. En les exploracions complementàries es troba una lleugera anèmia (hemoglobina de 12.8 g/l) amb macrocitosi (volum corpuscular mitjà de 107.9 fl) i un índex de Quick del 67%. En l'anàlisi bioquímica de la sang apareix una urea de 118 mg/dl, un potassi de 5.6 mEq/l, el sodi és de 133 mmol/l, la creatinina de 2.6 mg/ml i els enzims hepàtics, l'alaninaaminotransferasa i l'aspartataminotransferasa eren de 71 U/l i 154 U/l respectivament. Destaca un calci de 16.2 mg/dl. La radiografia de tòrax i el sediment d'orina són normals.

Per això, amb el diagnòstic de cirrosi hepàtica alcohòlica, encefalopatia hepàtica grau II-III/IV, insuficiència renal aguda, hiperpotassèmia lleu i hipercalcèmia a estudi, es remet el pacient a l'hospital per a ingrés.

Davant la persistència de la hipercalcèmia, es confirma amb la calcèmia corregida (=15.76). Per al diagnòstic

diferencial de la hipercalcèmia se sol·licita una tomografia axial computada (TAC) toracoabdominopelviària, nivells d'hormona paratiroidal (PTH en les seues sigles en anglés, *parathyroid hormone*), enzim convertit de l'angiotensina (ECA), antigen prostàtic específic (PSA en les seues sigles en anglés, *prostate-specific antigen*) i hormona estimulant del tiroide (TSH en les seues sigles en anglés, *thyroid-stimulating hormone*), així com un proteïnograma.

La TAC informa d'un fetge de mides augmentades, sobretot el lòbul dret, d'aspecte inflamatori crònic amb la superfície lleugerament lobulada i sense lesions focals. En el pàncreas es troba una petita formació hipodensa a la cua compatible amb un pseudoquist. Hi ha una moderada esplenomegàlia i no s'hi veu líquid lliure. Tot això descarta l'origen tumoral de la hipercalcèmia. En l'anàlisi sanguínia destaquen els següents valors: àcid úric, 12 mg/dl; bilirubina total, 2.4 mg/dl; PSA, 0.22 ng/ml, que descarta un tumor prostàtic; TSH, 2.11 mU/l, que descarta un hipertiroidisme; proteïnograma normal, que descarta un mieloma; albúmina, 3.63 g/dl; ECA, 67 mU/ml, que descarta una sarcoidosi; i PTH intacta de 132 pg/ml, que dona el diagnòstic d'hiperparatiroidisme primari.

A partir d'aquest diagnòstic s'inicia un tractament amb àcid zoledrònic intravenós (iv) per a reduir la calcèmia. Es practica una gammagrafia amb tecneci 99 metaestable-sestamibi ( $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi) en què es detecta dipòsit d'activitat anormal aparentment sobre el pol inferior del lòbul tiroïdal dret, tant en fase precoç com en fase de rentatge (**figura 1**), que és compatible amb una patologia paratiroidal dreta. Una vegada corregida la calcèmia, amb el diagnòstic d'hipercalcèmia simptomàtica per hiperparatiroidisme primari, es deriva a Cirurgia per a la realització d'una paratiroidectomia.

## Discussió

Es parla d'hipercalcèmia quan les xifres de calci total són majors de 10.5 mg/dl. La seua prevalença es del 0.1-1% de la població, segons les sèries, augmenta amb l'edat i és més freqüent en dones (3:1), sobretot després de la menopausa. De fet, el 70% de casos nous són dones postmenopàusiques. Els mecanismes fisiopatològics d'instauració de la hipercalcèmia són tres: a) augment de la resorció per osteoclasts (90%), que és el cas de l'hiperparatiroidisme primari o de la hipercalcèmia tumoral; b) augment de l'absorció intestinal de calci, el que s'esdevé en malalties granulomatoses o limfomes; i c) disminució de l'excreció renal de calci, associat a l'ús de diürètics. Dins de l'etiologia de la hipercalcèmia s'hi distingeixen dos grans grups, les mitjançades per la PTH i les no mitjançades per aquesta (**taula I**). Entre les primeres destaca l'hiperparatiroidisme primari, que és la causa més freqüent d'hipercalcèmia en pacients ambulatoris i entre les segones, la hipercalcèmia tumoral, que

és la causa més freqüent d'hipercalcèmia en pacients hospitalitzats.

El més freqüent és que la hipercalcèmia tinga un curs asimptomàtic, però quan apareix clínica poden presentar-se signes i símptomes a qualsevol nivell: renals (nefrolitiasi, nefrocalcinosi, insuficiència renal, poliúria, nictúria amb deshidratació), gastrointestinals (nàusees, vòmits, anorèxia, pèrdua ponderal, restrenyiment, dolor abdominal, úlcera pèptica, pancreatitis aguda), ossis (osteoporosi, osteïtis fibrosa quística, pseudogota, condrocalcinosi, artritis, artràlgies), neuromusculars (cansament, dolor muscular), neuropsiquiàtriques (confusió, estupor, coma, depressió, ansietat, irritabilitat, psicosis), cardiovasculars (HTA, interval QT curt, arítmies, calcificacions valvulars) o altres (pruïja, queratopatia de franges).

En el maneig diagnòstic de la hipercalcèmia, en primer lloc s'ha de confirmar aquesta mitjançant el càlcul de la calcèmia corregida per a l'albúmina sèrica. Es considera hipercalcèmia quan els nivells superen els 10.5 mg/dl. Fins a 12 mg/dl es considera lleu. Entre aquest valor i 14 mg/dl, moderada i és greu quan supera aquest últim valor. Una vegada diagnosticada la hipercalcèmia s'ha de fer una anamnesi i un examen físic exhaustiu a la recerca de possibles causes, medicacions, etc. i mesurar la PTH intacta. Aquesta la podem trobar suprimida, normal o alta. En cas de trobar-la suprimida, s'ha de sol·licitar la proteïna relacionada amb l'hormona paratiroidal (PTHrP en les seues sigles en anglés, *parathyroid hormone related protein*) a la recerca de neoplàsies sòlides i altres marcadors tumorals (PSA, fosfatasa alcalina a la recerca d'osteòlisi, etc.). Si no es troben tumors, s'han de descartar altres endocrinopaties com l'hipertiroidisme (mitjançant la determinació de TSH), insuficiència adrenal (mitjançant el cortisol plasmàtic) o malalties granulomatoses (mitjançant el calciúria). Si s'obtenen uns nivells de PTH normals o alts, s'ha de sol·licitar la calciúria de 24 hores. Si aquesta és baixa, ens trobem davant una hipercalcèmia hipocalciúrica familiar (HHF). Si els valors en són normals estem davant un hiperparatiroidisme terciari i si en són baixos, es tracta d'un hiperparatiroidisme primari.

En el tractament de la hipercalcèmia aguda s'han de prendre, en primer lloc, una sèrie de mesures generals, com retirar medicacions afavoridores si n'hi haguera, evitar la immobilitat, corregir-ne la causa i procedir a la hidratació adequada del pacient. Després de tot açò, es procedeix a l'administració de furosemida iv i inhibidors de la resorció òssia, com ara bifosfonats iv (pamidronat, clodronat o zoledronat) i/o calcitonina de salmó intramuscular o subcutània. Quan la hipercalcèmia és deguda a malalties granulomatoses, intoxicacions per vitamina D o en alguns tumors, es fan servir corticoides com a inhibidors de l'absorció intestinal de calci. Però el tractament etiològic en el hiperparatiroidisme primari és la paratiroidectomia, que és el tractament d'elecció en tots els pacients simptomàtics (amb nefrolitiasi o ne-

frocalcinosi, amb malaltia òssia radiològica, amb malaltia neuromuscular clàssica, amb un episodi previ de crisi hipercalcèmica o amb hiperparatiroidisme familiar) i en tots els pacients asimptomàtics que tinguen una sèrie de criteris establerts en un consens de 1990, revisat el 2002 i novament el 2008 (taula II).

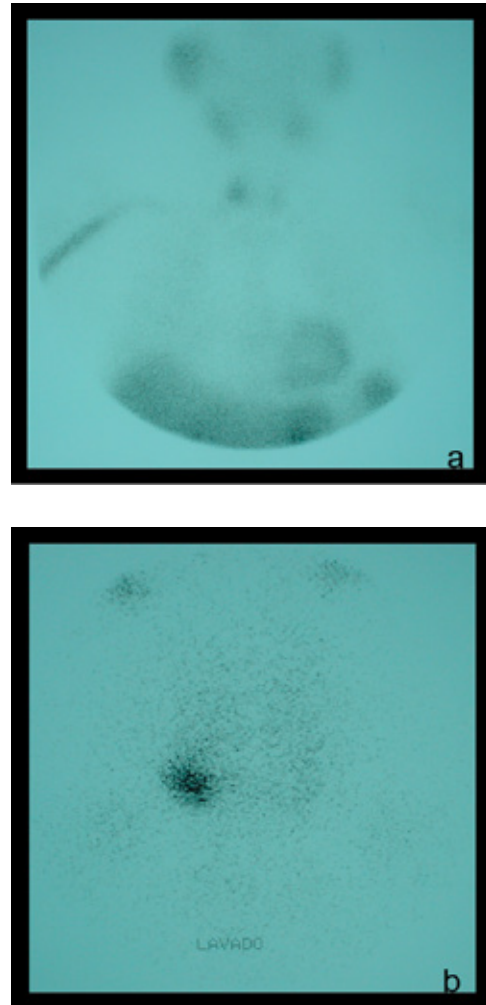
Taula I: Etiologia de la hipercalcèmia

ETIOLOGIA DE LA HIPERCALCÈMIA
<p><b>HIPERCALCÈMIA MITJANÇADA PER L'HORMONA PARATIROÏDAL (PTH):</b></p> <p><b>-Hiperparatiroidisme primari:</b>                      Adenoma esporàdic (80-85%).                      Hiperplàsia (15-20%).                      Carcinoma (~1%).                      Síndromes familiars:                      • Neoplàsia endocrina múltiple 1.                      • Neoplàsia endocrina múltiple 2A.                      • Hiperparatiroidisme primari familiar aïllat.                      • Hipercalcèmia hipocalciúrica familiar.</p> <p><b>- Hiperparatiroidisme terciari:</b> Les glàndules paratiroides continuen produint un excés de PTH, malgrat que el nivell de calci ha retornat al seu rang normal. Ocorre com a complicació d'un hiperparatiroidisme secundari crònic en la insuficiència renal o després d'un trasplantament renal.</p>
<p><b>HIPERCALCÈMIAS NO MITJANÇADES PER LA PTH:</b></p> <p><b>- Tumoral:</b>                      Hipercalcèmia tumoral humoral o paraneoplàstica mitjançada per la proteïna relacionada amb la PTH (PTHrP), factor de creixement tumoral <math>\beta</math>-1 (TGF-<math>\beta</math>1), interleucina 1 (IL-1) o per secreció ectòpica de PTH: Tumors sòlids epidermoides de pulmó, de cèl·lules escamoses de cap i coll, esòfag, hipernefoma, ovari, cèrvix, colangiocarcinoma, VIPoma.                      Hipercalcèmia tumoral per osteòlisi local mitjançada o no per citocines:                      • Mieloma múltiple.                      • Limfomes.                      • Càncer de mamella.                      • Càncer de pulmó.                      • Càncer de pàncreas.</p> <p><b>- Malalties endocrines:</b>                      Hipertiroidisme.                      Insuficiència adrenal.                      Feocromocitoma.</p> <p><b>- Fàrmacs:</b> Diürètics tiazídics, liti, teofil·lina, sobredosi de vitamina D o dels seus metabòlits, síndrome de llet i alcalins, foscarnet, tamoxifèn.</p> <p><b>- Malalties granulomatoses:</b> Sarcoidosi, beril·liosi, granulomatosa induïda per parafina o silicona, malaltia de Wegener, granuloma eosinòfil, tuberculosi, candidosi, coccidioïdomicosi, lepra, histoplasmosi.</p> <p><b>- Miscel·lània:</b>                      Immobilitat prolongada per malaltia de Paget.                      Rabdomiòlisi.                      Intoxicació per manganès.</p>

Taula II: Indicacions quirúrgiques de l'hiperparatiroidisme primari asimptomàtic

INDICACIONS QUIRÚRGIQUES EN L'HIPERPARATIROIDISME PRIMARI ASIMPTOMÀTIC
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Edat inferior a 50 anys.</li> <li>- Calci sèric major d'1 mg/dL per sobre del límit superior de referència.</li> <li>- Densitat òssia T-score menor de -2.5 desviacions estàndard en qual-sevol lloc i/o fractura prèvia per fragilitat.</li> <li>- Depuració de creatinina menor de 60 ml/min.</li> <li>- Absència de garantia d'un adequat monitoratge crònic.</li> </ul>

Figura 1: Gammagrafia amb <sup>99m</sup>Tc-sestamibi; a) fase precoç; b) fase de rentatge



## Conclusions

Malgrat els antecedents d'hepatopatia del pacient i tractar-se d'un quadre clínic compatible amb descompensació, va obligar a descartar altres causes de la clínica. És molt il·lustratiu de com el clínic no ha d'acceptar d'immediat una explicació que sembla clara. La hipercalcèmia pot produir una síndrome bigarrada que pot ser confosa amb molts altres processos. En aquest cas, la insuficiència renal aguda, la anorèxia, les nàusees, els vòmits, l'estat de confusió i estupor i la pruija van ser atribuïts a la hipercalcèmia simptomàtica. Cal recordar que davant qualsevol estat confusional és obligatori demanar els nivells de calcèmia. El diagnòstic d'hiperparatiroidisme primari està basat en la determinació de la PTH junt a proves d'imatge (gammagrafia), alhora que es descarten altres causes d'hipercalcèmia.

## Bibliografia

1. Bilezikian JP, Khan AA, Potts JT J; Third International Workshop on the Management of Asymptomatic Primary Hyperthyroidism. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperthyroidism: summary statement from the third international workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:335-9.
2. Bilezikian JP, Potts JT Jr, Fuleihan Gel-H, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, et al. Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperthyroidism: a perspective for the 21st century. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:5353-61.
3. Cabezas Agrícola JM. Hipercalcemia. *Medicine.* 2004; 9:1055-62.
4. Cabezas Agrícola JM, Cabezas-Cerrato J. Protocolo diagnóstico y terapéutico de la hipercalcemia. *Medicine.* 2004; 9:1077-9.
5. Castillo Núñez Y, Reza Albarrán A. Manejo del hiperparatiroidismo primario asintomático. *Rev Endocrinol Nutr.* 2009; 17:36-45.
6. Potts JT. Enfermedades de las glándulas paratiroides y otros procesos hipercálcemicos e hipocalcémicos. En: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Eds): *Harrison. Principios de Medicina Interna*, Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, 15ª ed., 2002; 2583-96.
7. Sklavenitis-Pistofidis R, Papaioannou O, Kotsa K. Primary hyperparathyroidism and the road to surgery: appraisal of the proceedings of the four international workshops (1990, 2002, 2008, 2014) on primary hyperparathyroidism. *Hormones (Athens)* 2015;14:201-10.
8. Spiegel AM. The Parathyroid glands, hypercalcemia, and hypocalcemia. En: Goldman L, Bennett JC (Eds): *Cecil. Textbook of Medicine*, WB Saunders Company, Filadèlfia, 21ª ed., 2000; 1400-4.
9. Taniagra ED. Hyperparathyroidism. *American Family Physician.* 2004; 69:333-9.

## ESTUDI DE CASOS

## Varón de 53 años inmunodeprimido con fiebre e infiltrado pulmonar bilateral

*53 years old male immunosuppressed with fever and bilateral pulmonary infiltrate*

**Inés Herráez Balanzat<sup>1</sup>, Rafael Ramos Asensio<sup>2</sup>, Julia Moreno Sánchez<sup>3</sup>,  
Leyre Bento de Miguel<sup>1</sup>, Manuel del Río Vizoso<sup>4</sup>**

*1. Servicio de Hematología. 2. Servicio de Anatomía Patológica.  
3. Servicio de Cuidados Intensivos, 4. Unidad de Hospitalización a Domicilio.  
Hospital Universitario Son Espases*

### Correspondencia

Manuel del Río Vizoso

Unidad de Hospitalización a domicilio, Planta 0, modulo F.

Hospital Universitario Son Espases - Carretera de Valldemossa, 79  
07010 - Palma de Mallorca

**Recibido:** 18 - I - 2016

**Aceptado:** 23 - III - 2016

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.31.01.47

### Resum

Varón de 53 años con trasplante alogénico como tratamiento de un mieloma múltiple que presenta, en el día 54 postrasplante, fiebre, tos y afectación del estado general por lo que ingresa en el hospital. Presenta infiltrados pulmonares bilaterales y mala respuesta a tratamiento empírico, por lo que ingresa en UCI con distress respiratorio, falleciendo durante el ingreso por fallo multiorgánico.

*Paraules clau:* infiltrados pulmonares bilaterales, mieloma múltiple, fiebre

### Abstract

53 years old male with a multiple myeloma treated with allogenic transplant comes to the emergency unit with fever, cough and bad condition. He is admitted to the hospital. A CT shows bilateral pulmonary infiltrates and, despite empirical broad spectrum antibiotics, he is admitted to the ICU because of lack of response and acute respiratory distress syndrome. He suffers multiorgan shock, dying at the ICU.

*Keywords:* bilateral pulmonary infiltrates, multiple myeloma, fever

### Caso clínico

Se trata de un varón de 53 años diagnosticado de Mieloma de cadenas ligeras Lambda estadio IIIA que fue tratado con quimioterapia (Lena-DXM 11 ciclos) y RT sobre plasmocitomas con buena respuesta, y posteriormente recibió un trasplante alogénico no mieloablato emparentado presentando, como complicaciones tras el trasplante, un EICH (enfermedad injerto contra huésped) grado II hepático y cutáneo.

El día + 54 postrasplante presentó empeoramiento del estado general con tos y fiebre por lo que ingresó en el hospital, destacando únicamente en las pruebas complementarias una serología para CMV positiva (17462 copias/mL) con galactomanano negativo. Se inició tratamiento con ganciclovir por sospecha de infección respiratoria.

Presentó buena evolución durante los días siguientes, con estabilidad clínica y mejoría de los síntomas que se acompañó de descenso de copias de CMV tras

11 días de tratamiento (628 copias/mL). También se realizó radiografía de tórax y TAC torácica que mostró áreas parcheadas bilaterales de condensación pulmonar asociadas con áreas en vidrio deslustrado, algunas de morfología pseudonodular, de distribución subpleural y peribroncovascular (ver **imagen 1**).

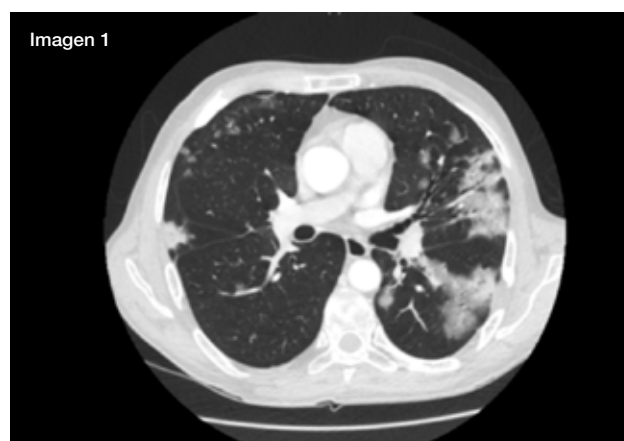


Imagen 2



Imagen 3



En los días posteriores, a pesar de tratamiento con antibioterapia de amplio espectro, el paciente sufrió empeoramiento clínico rápidamente progresivo con aumento de condensaciones a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria grave, que progresó a distress respiratorio y requirió ingreso en UCI (ver **imágenes 2 y 3**)

Al ingreso en UCI precisó de intubación y conexión a ventilación mecánica, reposición de volemia abundante y soporte vasoactivo con noradrenalina a dosis elevadas. Sufrió progresivo deterioro de la función renal y acidosis metabólica con ácido láctico elevado que requirió de terapia continua de sustitución renal.

Durante el ingreso en UCI se solicitaron cultivos, de los que únicamente resultó positivo un frotis faríngeo para VRS, y se solicitaron copias de CMV que fueron 152/mL, y galactomanano, que resultó negativo. Recibió tratamiento con meropenem, ganciclovir, cotrimoxazol, voriconazol y ribavirina inhalada de forma empírica. Finalmente, a pesar del tratamiento instaurado el paciente falleció tras 32 días de ingreso hospitalario por shock séptico con fracaso multiorgánico refractario.

## Discusión

La discusión de este caso se centra en las complicaciones post-trasplante que justificarían la clínica respiratoria dentro de los primeros 3 meses y que podrían haberse desarrollado en nuestro paciente. Hablaríamos de infecciones, síndromes endoteliales vasculares, EICH y fallo de injerto y, por último, toxicidad por fármacos<sup>1</sup>.

### Infecciones:

La patología infecciosa es muy susceptible de estar presente en pacientes con enfermedades hematoló-

gicas, principalmente en trasplantados alogénicos (inmunodeprimidos)<sup>2</sup>.

Nuestro paciente presentó en todo momento hemocultivos negativos, por lo que en principio se podrían descartar las infecciones por bacterias, y permite centrarnos en los hongos y las infecciones virales (**tabla I**)<sup>3</sup>.

Tabla I: Infecciones

<b>Bacterias</b>	Cocos gram positivos Bacilos gram negativos Anaerobios
<b>Hongos</b>	<i>Aspergillus spp</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i>
<b>Virus</b>	Citomegalovirus (CMV) Virus Herpes Humano 6 (VHH6) Virus Respiratorio Sincitial (VRS) Influenza Adenovirus

Los factores de riesgo se describen en la **tabla II**:

Tabla II: Factores de riesgo

<b>Estado de inmunosupresión</b>	No remisión completa de la enfermedad de base Neutropenia Tratamiento con glucocorticoides (>1 mg/kg/día) Infección viral concomitante <40 años
<b>Disfunción orgánica</b>	Presencia de mucositis
<b>Tipo de trasplante</b>	Alogénico



El diagnóstico de infección viral tiene un amplio espectro clínico, pudiendo producir una clínica de insuficiencia respiratoria con un patrón pulmonar de infiltrado difuso o parcheado, y siendo un factor de riesgo en este caso el antecedente del uso de Fludarabina como acondicionamiento del trasplante. Por otro lado, la ya confirmada infección por CMV aumentaría la probabilidad de coinfección por otro virus, siendo el más probable el VRS.

Los factores de riesgo que aumentarían el riesgo de infección fúngica en nuestro caso son los mostrados en la **tabla III**<sup>4</sup>:

**Tabla III:** Factores de riesgo para infección fúngica

Mucositis
Tratamiento con corticoides
Neutropenia
Infección viral concomitante

Nuestra primera sospecha sería la infección por *Aspergillus spp.*, ya que concordaría con la clínica presente, siendo típica la afectación de senos paranasales, y pudiendo no ser descartada a pesar de presentar antígenos de galactomanano negativos (falsos negativos).

Es una infección con una alta mortalidad y que se confirmaría por positividad de las muestras recogidas mediante fibrobronoscopia (pendientes en el momento del *exitus*).

Otra posibilidad sería la infección por *Pneumocystis jirovecii*, aunque hoy en día, debido a la profilaxis con Trimetoprim-sulfametoxazol, ha disminuido mucho su incidencia.

### Síndromes endoteliales vasculares

Dentro de ellos, como diagnóstico muy probable y con alta mortalidad, hablar de la hemorragia alveolar<sup>5</sup>. Nos haría pensar en ella la clínica respiratoria con el patrón radiológico presente y la presencia de sangrado en aumento en lavados broncoalveolares consecutivos. Debido a que la causa es multifactorial, las infecciones tendrían un valor aquí. Como factores de riesgo, el mismo trasplante alogénico lo sería y aunque no está descrita la plaquetopenia como tal, sí que se ha visto que puede ser un factor agravante.

Otras entidades menos probables, por su momento de instauración y clínica producida, serían los síndromes de obstrucción sinusoidal<sup>6</sup>, de prendimiento<sup>7</sup>, de hiperpermeabilidad capilar y de neumonía idiopática.

### EICH y fallo de injerto

El tercer grupo de patologías englobadas en nuestro diagnóstico diferencial sería las de origen inmunológico, debido a que el trasplante alogénico las hace más probables. Una de ellas sería el EICH agudo de origen hepático, que sería poco probable ya que suele coexistir con la

afectación digestiva (inexistente en nuestro caso), y habitualmente cursa con aumento de enzimas de colestasis. La presencia de fiebre no nos descartaría el diagnóstico.

### Toxicidad por fármacos

Una posibilidad sería la neumonitis inflamatoria, poco probable en este caso. A pesar de que puede producirse secundariamente al tratamiento con Melfalán, suele ser aparecer más tardíamente y sin aislamiento infeccioso.

### Diagnóstico clínico: posibilidades.

- Probable fallo multiorgánico por shock séptico secundario a CMV.
- Infección por hongo *Aspergillus spp.*
- Posible coinfección/sobreinfección por VRS.
- Hemorragia alveolar difusa.

## Estudio anatomopatológico

Hombre adulto de raza caucásica que presentaba extensas lesiones cutáneas de aspecto necrótico hemorrágico tipo epidermolisis en cuello y pared torácica anterior. El examen interno de la cavidad torácica mostraba un derrame pleural seroso bilateral masivo, pulmones con pleura brillante, muy aumentados de peso, (2450g conjuntos), con parénquima de aspecto congestivo (**imagen 4a**), edematoso con áreas hemorrágicas inferiores al 20% del volumen pulmonar y sin lesiones ocupantes de espacio.

En la cavidad abdominal no se observaba derrame y las vísceras presentaban signos congestivos agudos sin otras particularidades. La cavidad craneal presentaba meninges de aspecto congestivo y los cortes coronales del cerebro mostraban una lesión sugestiva de infarto hemorrágico de 4 cm en lóbulo frontal izquierdo (**imagen 4b**) y un área reblandecida de aproximadamente 5 cm a nivel parietal derecho. Asimismo se observaban áreas hemorrágicas petequiales en cuerpo caloso, mesencéfalo, base del puente y sustancia blanca del cerebelo. La médula ósea mostraba una coloración pálida amarillenta sin lesiones macroscópicas residuales.

### Estudio histológico:

La médula ósea era hipocelular con formas de las tres series y sin infiltración neoplásica residual (**imagen 5**). Los pulmones estaban afectados de forma difusa por edema, necrosis alveolar y descamación de neumocitos, con material fibrináceo y formación de membranas hialinas (**imagen 6**), asociadas a áreas de hemorragia que ocupaban menos del 20-25% de la superficie pulmonar (**imagen 7**). Se apreciaban neumocitos aislados con atipia citológica inespecífica de tipo citopático sin claras inclusiones víricas (**imagen 8**), correspondiendo todo ello a un patrón de daño alveolar difuso (DAD) de etiología multifactorial y asociado a infección por VRS (la muestra pulmonar remitida para cultivo microbiológico mostró amplificación genómica del grupo del VRS).

El resto de órganos mostraba congestión aguda generalizada secundaria a disfunción orgánica por fallo pulmo-

nar. En el cerebro las lesiones descritas se correspondían a infartos hemorrágicos.

Imagen 4a

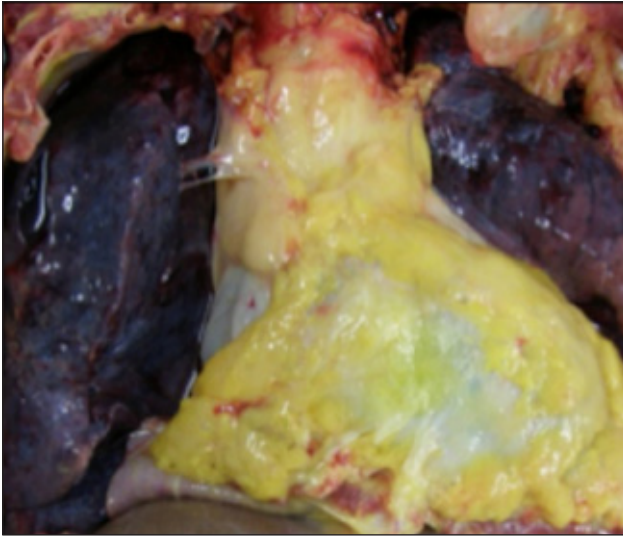


Imagen 4b



Imagen 5

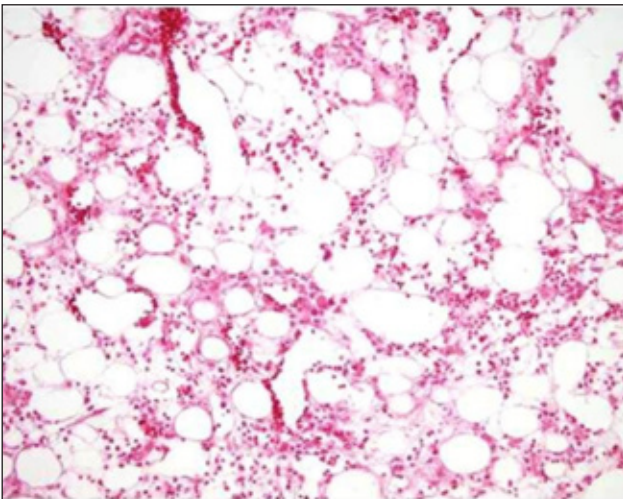


Imagen 6

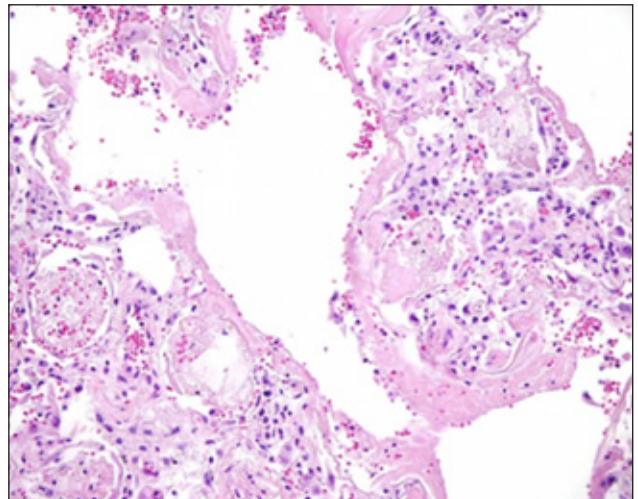


Imagen 7

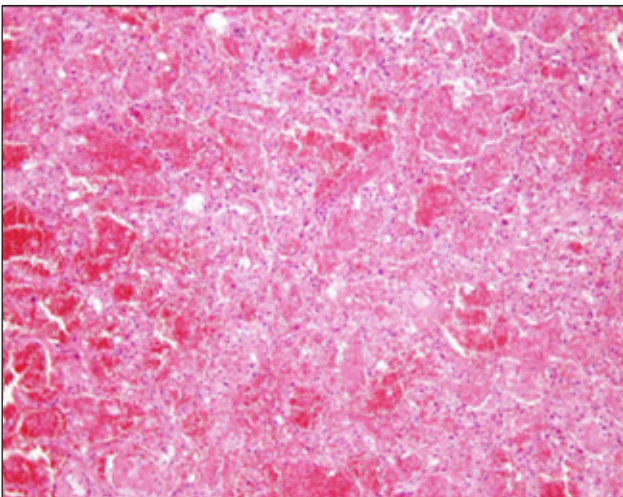
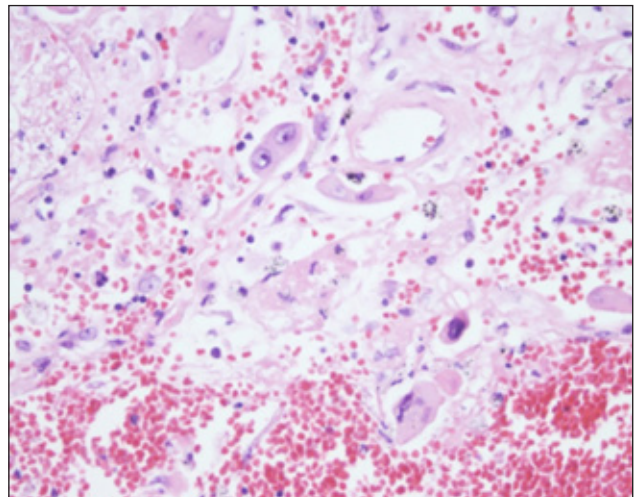


Imagen 8



## DIAGNÓSTICOS

- Estado post TCMH autólogo por Mieloma Múltiple
  - Ausencia de infiltración neoplásica
  - Hipoplasia medular post TCMH
- DAD asociado a
  - Neumonía por VRS
  - Hemorragia alveolar focal asociada a infección
- Infartos cerebrales
- Congestión visceral generalizada
- Epidermólisis NE

En los pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas, las complicaciones pulmonares aparecen en un 30-60% de los casos y son la causa inmediata en el 60% de las muertes. Pueden ser infecciosas o no infecciosas, siendo éstas las más frecuentes.

## Bibliografía

1. Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest.* 2014 Aug; 32(7):349-62.
2. M. Salavert, R. Granada, A. Díaz, R. Zaragoza. Papel de las infecciones víricas en pacientes inmunodeprimidos. *Med Int*, Vol 35, Tema 2, 117-125
3. Ren Lin and Qifa Liu. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol.* 2013, 6:94
4. Walsh TJ, Gamaletsou MN. Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013; 2013:423-7
5. Majhail NS, Parks K, DeFor TE, Weisdorf DJ. Diffuse alveolar hemorrhage and infection-associated alveolar hemorrhage following hematopoietic stem cell transplantation: related and high-risk clinical syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006 Oct;12(10):1038-46
6. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 2015 Feb;168(4):481-91.
7. Spitzer TR. Engraftment syndrome following hematopoietic stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant.* 2001 May; 27(9):893-8.
8. Afessa B, Peters SG. Major complications following hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27(3): 297-306
9. Afessa B, Peters SG. Noninfectious pneumonitis after blood and marrow transplant. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 227-33

Las causas infecciosas son más frecuentes en trasplantes alogénicos. En la fase inicial los microorganismos son bacterias, cándidas y aspergillus en neutropenias. Posteriormente predominan el CMV, virus respiratorios comunitarios (VRS) y pneumocystis. En infecciones más tardías encontraremos CMV, VRS y bacterias encapsuladas<sup>8</sup>.

Cuando no se puede demostrar agente infeccioso se clasifican en otras entidades, siendo las más típicas el síndrome de neumonía idiopática, la hemorragia alveolar difusa y el síndrome de distress respiratorio periinjerto<sup>9</sup>. Las dos primeras presentan daño alveolar difuso como patología y la segunda, además, hemorragia en, al menos, el 30% del volumen alveolar. En nuestro caso el DAD está asociado al final con infección por el VRS y con hemorragia alveolar por infección (HAD-I); por ello, se estableció como causa de muerte una insuficiencia respiratoria intensa de etiología multifactorial y asociada a infección por VRS.

# TARJETA EXCLUSIVE

Disfruta de las ventajas de la primera tarjeta "Etiqueta Negra".



Te presentamos la nueva tarjeta **Exclusive de Banca March**, una tarjeta diseñada especialmente para nuestros clientes más exclusivos.

**Disfruta de un excepcional abanico de servicios y descuentos exclusivos:** servicio de reservas, descuentos en spas, balnearios y campos de golf, plan de protección de tarjetas y de teléfono móvil, seguro de asistencia en viajes con las coberturas más amplias del mercado, seguro de accidentes de 1 millón de euros y un largo etcétera, que sitúan al más alto nivel a la tarjeta Exclusive y a su titular.

Infórmate en nuestras oficinas, en [www.bancamarch.es](http://www.bancamarch.es) o llamando al teléfono **901 111 000**

Más de **80 años** a tu servicio | **TRADICIÓN DE FUTURO**

 **BANCA MARCH**



www.ramib.org

## Junta Directiva de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears

---

<b>President</b>	Macià Tomàs Salvà
<b>Vicepresident</b>	Fèlix Grases Freixedas
<b>Secretari General</b>	Antonio Cañellas Trobat
<b>Vicesecretari</b>	Josep F. Forteza Albertí
<b>Tresorer</b>	Joan Besalduch Vidal
<b>Bibliotecari</b>	Ferran Tolosa Cabani

## Acadèmics d'honor

---

2003 -	Excm. Sr. Santiago Grisolia García, Premi Príncep d'Astúries
2007 -	Excm. Sr. Ciril Rozman, Premi Jaime I

## Acadèmics numeraris

---

M.I. Sr. Miguel Munar Qués  
M.I. Sra. Juana Ma Román Piñana  
M.I. Sr. José Tomás Monserrat  
M.I. Sr. Arnaldo Casellas Bernat  
M.I. Sr. José Miró Nicolau  
M.I. Sr. Bartolomé Anguera Sansó  
M.I. Sr. Bartolomé Nadal Moncadas  
M.I. Sr. Alfonso Ballesteros Fernández  
M.I. Sr. Francesc Bujosa Homar  
M.I. Sr. Ferran Tolosa Cabani  
Excm. Sr. Macià Tomàs Salvà  
M.I. Sra. Juana Ma Sureda Trujillo  
M.I. Sr. Juan Buades Reinés  
M.I. Sr. José L. Olea Vallejo  
M.I. Sr. Pere Riutord Sbert  
M.I. Sr. Joan Besalduch Vidal  
M.I. Sr. Fèlix Grases Freixedas  
M.I. Sr. Antonio Cañellas Trobat  
M.I. Sr. Josep F. Forteza Albertí  
M.I. Sr. Jordi Ibáñez Juvé  
M.I. Sr. Joan March Noguera  
M.I. Sr. A. Arturo López González

## Acadèmics supernumeraris

---

M.I. Sr. Alvaro Agustí García-Navarro  
M.I. Sra. Marta Couce Matovelle

## Protectors de la Reial Acadèmia

---

Banca March  
Col·legi Oficial de Metges de les Illes Balears  
ASISA

## Benefactors de la Reial Acadèmia

---

Consell de Mallorca  
Salut i Força

## Patrocinadors de la Reial Acadèmia

---

Clinica Rotger  
Fundación MAPFRE  
Médicos Rosselló  
Quirón Palmaplanas  
AMA  
Col·legi Oficial d'Infermeria de les Illes Balears

# MEDICINA · BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADEMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

[www.medicinabaleaer.org](http://www.medicinabaleaer.org)