

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

- II.1. Universo, población y muestra de estudio
- II.2. Diseño de la investigación
- II.3. Evaluación nutricional
- II.4. Procesamiento estadístico

II.1. Universo, población y muestra de estudio

Universo: Hasta el mes de Noviembre del 2006 se habían registrado en la provincia de Pinar del Río 253 personas con VIH/sida. De ellas, habían fallecido 100 (39.5%).

Entre Noviembre del 2006 y Mayo del 2010 se captaron como VIH-seropositivas otras 180 personas. De ellas, fallecieron 11 (6.1%). Por consiguiente, el universo del estudio abarcó 322 personas con VIH/sida (*Hombres: 74.8%*).

Población de estudio en el momento de la admisión: Entre Noviembre del 2006 y Mayo del 2010 se completó la evaluación nutricional e inmunológica de 217 personas con VIH/sida (*Hombres: 72.3%; Tratados con ARV: 33.2%*). El 87.5% de los pacientes tratados utilizaban fármacos de producción nacional. Los otros restantes usaban fármacos de segunda | tercera generación (MINSAP, 2009). Los pacientes evaluados representaron el 67.4% del universo de estudio.

Muestra de estudio: De las 217 personas con VIH/sida incorporadas inicialmente al presente estudio, solo fue posible revalorar a los 12 meses (fecha de cierre de la ventana de observación) a 118 individuos (*Hombres: 72.9%; Tratados con ARV: 39.0%*). Estos pacientes conformaron la muestra del estudio. La muestra representó el 54.4% la población de estudio, y el 36.6% del universo de estudio.

Criterios de inclusión: Adultos de ambos sexos con un diagnóstico confirmado de seropositividad al VIH-1, atendidos ambulatoriamente, que acudieron (al menos) una vez, durante la ventana de observación del estudio, a las citas realizadas por el Departamento Provincial de Prevención y Control de las ITS/VIH/sida de la provincia para la determinación de los linfocitos T CD4+, y que, además, consintieron en participar voluntariamente en el estudio mediante la lectura y firma de la correspondiente acta de Consentimiento Informado.

Criterios de exclusión: Menores de 19 años de edad, embarazadas, adultos con alguna enfermedad metabólica concurrente, o que usaran esteroides anabólicos. Se excluyeron también a las personas con VIH y terapia antirretroviral que no tenían buena adherencia al tratamiento, según información referencial del especialista de la atención primaria que los atendía en la consulta provincial.

Criterios de salida: Fallecidos durante la ventana de observación del estudio.

II.2. Diseño de la investigación

Según el esquema de clasificación de las investigaciones epidemiológicas cuantitativas, el presente estudio se correspondió con una investigación observacional analítica, longitudinal y prospectiva, que incluyó dos momentos: el primero, en el momento de admisión en el estudio; y el segundo, al año de seguimiento. A partir del método matemático empleado en la fase de seguimiento, y que se detalla en el acápite dedicado al procesamiento estadístico en el presente capítulo, esta investigación se clasifica, además, como un estudio de tipo exploratorio.

Los pacientes incluidos inicialmente en el estudio se segregaron en 4 grupos de acuerdo con el estado de la TAR y el conteo de las células T CD4+: **Grupo I:** Individuos VIH-positivos no tratados con ARV y linfocitos T CD4+ ≥ 350 ; **Grupo II:** Individuos VIH-positivos no tratados con ARV y linfocitos T CD4+ < 350 ; **Grupo III:** Individuos VIH-positivos tratados con ARV y linfocitos T CD4+ ≥ 350 ; y **Grupo IV:** Individuos VIH-positivos tratados con ARV y linfocitos T CD4+ < 350 ; respectivamente.

Como punto de corte para la evaluación de los conteos CD4, se utilizó el criterio inmunológico para el inicio de la TAR que ha sido recomendado por las “Pautas Cubanas para el tratamiento antirretroviral en los pacientes con VIH/sida”.¹

II.3. Evaluación nutricional

II.3.1. Mediciones antropométricas: Se cumplieron los requisitos y recomendaciones generales para la realización de las técnicas antropométricas previstas, tal y como se han descrito previamente.²

II.3.2. Evaluación de los dominios bioquímicos e inmunológicos

II.3.2.1. Obtención de las muestras biológicas: Se realizó la extracción de 10 mL de sangre por venipuntura en una de las venas de la fosa antecubital. Se siguieron las medidas de precaución recomendadas para el trabajo con pacientes VIH-seropositivos.³

La sangre obtenida fue distribuida en dos tubos de ensayos, uno de los cuales contenía EDTA (Ácido Etilén-Diamino-Tetracético) al 6% como anticoagulante, a razón de una gota del mismo por cada mL de sangre. La sangre EDTA-anticoagulada se utilizó para la realización de los conteos globales de linfocitos (CTL) y el recuento absoluto de los linfocitos T CD4+.

La sangre depositada en el tubo sin anticoagular se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente. El suero resultante se separó por centrifugación del tubo a 822 g en una centrífuga SELECTA (Zagreb, Yugoslavia). Las determinaciones bioquímicas se hicieron en el mismo día de la extracción de la sangre.

II.3.2.2. Determinaciones bioquímicas: Se determinaron las concentraciones séricas de albúmina, proteínas totales, triglicéridos, colesterol total, transferrina, y creatinina en un autoanizador discreto HITACHI 902 (Boehringer Mannheim, Alemania), ubicado en el Servicio de Laboratorio Clínico del Hospital Clínico Quirúrgico Docente “Abel Santamaría” (Pinar del Río, Pinar del Río). Se siguieron los protocolos analíticos vigentes corrientemente en el laboratorio.

Para la determinación de las HDL-c fue necesaria la precipitación previa del resto de las lipoproteínas con ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio.^{4,5} El colesterol presente en el sobrenadante se determinó mediante el mismo ensayo colorimétrico-enzimático empleado en el ensayo del colesterol total.⁶

La determinación de la LDL se realizó según la fórmula de Friedewald *et al.* (1972):⁷

$$\text{LDL, mmol.L}^{-1} = \text{CT} - [\text{HDL} + (\text{TG}/2.21)] \quad [1]$$

Se asume que las concentraciones de VLDL se pueden estimar de la cantidad $\text{TG} \div 2.21$ (Friedewald *et al.*; 1972).⁷

II.3.2.3. Conteos global y diferencial de linfocitos: El conteo global de linfocitos y el recuento absoluto de las células T CD4+ se realizaron en el Servicio de Laboratorio Clínico del Instituto IPK de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (La Habana). El conteo absoluto de los linfocitos T CD4+ se hizo en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Estados Unidos), con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (Becton-Dickinson, Estados Unidos).

El conteo global de linfocitos (CTL) se calculó indirectamente a partir del conteo diferencial de leucocitos a través de la siguiente fórmula:

$$\text{CTL, células.mm}^{-3} = \text{Número de Leucocitos} \times \text{Linfocitos, \%} \times 10 \quad [2]$$

II.3.3. Métodos de evaluación nutricional

II.3.3.1. Índice de Masa Corporal: La clasificación nutricional del individuo según el IMC se realizó de acuerdo con las referencias internacionales para la población adulta.⁸⁻¹⁰

IMC, Kg.m ⁻²	Clasificación
< 18.5	Peso disminuido para la Talla
18.5 – 24.9	Peso preservado para la Talla
≥ 25.0	Peso aumentado para la Talla

II.3.3.2. Algoritmo de Chang: El algoritmo propuesto por Chang utiliza 5 variables:¹¹⁻¹² tres antropométricas (a saber: pérdida de peso respecto del ideal, pliegue cutáneo tricípital y circunferencia muscular del brazo; junto con una bioquímica (albúmina sérica) y otra inmunológica (CTL); a fin de establecer la ausencia/presencia de desnutrición.

De acuerdo con el diseño del algoritmo de Chang, a cada uno de estos indicadores se les asignó un puntaje de acuerdo al grado de afectación. El puntaje de 1 correspondió a los valores no alterados del indicador, mientras que el puntaje de 4 se le asignó a aquellos con alteraciones graves del indicador en cuestión.

Cabe esperar un puntaje entre 3 – 12 si se presenta en el paciente afectación de las variables antropométricas. El puntaje sería de entre 2 – 8 de acuerdo con el grado de deterioro de las variables bioquímicas e inmunológicas. Se consideró un estado nutricional preservado cuando se alcanzó un valor límite de 4 para la suma de las variables antropométricas, y de 3 para las bioquímicas e inmunológica. Valores elevados de los puntajes, por separado o simultáneamente, indicaron la presencia de desnutrición.

II.3.3.3. Valoración Global Subjetiva (VGS) adaptada al VIH: La VGS del estado nutricional se condujo como ha sido descrita para las personas con VIH/sida.¹³ El puntaje final de la VGS integró la pérdida de peso, la presencia de síntomas digestivos, la historia dietética, la pérdida de grasa subcutánea y músculo esquelético, la presencia de ascitis y/o edemas, y la afectación del funcionalismo | autonomía del paciente.

El puntaje final de la VGS sirvió para asignar a la personas con VIH/sida a cualquiera de 3 grupos posibles: *Puntaje A:* Bien nutrido; *Puntaje B:* Moderadamente desnutrido | En riesgo de desnutrición; y *Puntaje C:* Gravemente desnutrido.¹³ La VGS fue conducida por uno de los integrantes del grupo de investigación que se mantuvo durante todo el estudio mediante en una entrevista cara-a-cara con la personas con VIH/sida.

II.4. Procesamiento estadístico

Los datos demográficos y clínicos obtenidos de las personas con VIH/sida, y los resultados de las determinaciones antropométricas, bioquímicas e inmunológicas; junto con los puntajes devueltos por el algoritmo de Chang y la ESG, se almacenaron en un contenedor digital creado con EXCEL versión 7.0 para OFFICE de WINDOWS (Microsoft, Redmon, Virginia, Estados Unidos).

Los datos se describieron mediante estadígrafos de posición (media), dispersión (desviación estándar) y agregación (porcentajes), según el tipo de la variable. La normalidad de las variables se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.¹⁴⁻¹⁵ El procesamiento estadístico de los datos se ajustó según los momentos de la investigación.

En el momento de admisión en el estudio: Fue de interés explorar la existencia de diferencias entre las subpoblaciones en las que la muestra de estudio fue particionada respecto de las variables demográficas, clínicas y nutricionales. Estas diferencias se exploraron mediante pruebas de comparación de proporciones para muestras independientes;¹⁶ pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney;¹⁷ y pruebas de independencia basadas en la distribución ji-cuadrado; según fuera el caso.¹⁸⁻¹⁹

La frecuencia de desnutrición en la presente serie de estudio se estimó según el punto de corte del método empleado: *IMC* <18.5 Kg.m⁻²; *Algoritmo de Chang:* Puntajes antropométricos ≥ 4 y/o Puntajes (bioquímico + inmunológico) ≥ 3 , indistintamente; y *VGS:* Puntajes (B + C); respectivamente.

La asociación entre los conteos CD4+ y el estado nutricional se identificó mediante pruebas basadas en la distribución ji-cuadrado después de distribuir los valores en una tabla de contingencia de 2 x 2. La fuerza de la asociación se estimó mediante el cálculo de la correspondiente razón de disparidades (OR) y su intervalo de confianza.¹⁶⁻¹⁹

Se construyeron funciones de regresión logística binaria²⁰ que incluyeron, como variables independientes, tanto el estado nutricional de la personas con VIH/sida (por cualquiera de los 3 métodos empleados) como el estado de la TAR; y como variable dependiente el conteo de los linfocitos T CD4+.

El conteo de linfocitos T CD4+ se categorizó de acuerdo con 2 puntos de corte diferentes, como sigue: *Primer caso:* {CD4 < 350} = 1 vs. {CD4 \geq 350} = 0; y *Segundo caso:* {CD4 < 200} = 1 vs. {CD4 \geq 200} = 0. El primer caso representa el punto de corte empleado localmente para el inicio de la TAR. El segundo caso representa el criterio de diagnóstico de un caso de Sida según la clasificación propuesta por el Centro CDC de Control de las Enfermedades de los Estados Unidos.²¹

Tabla 4. Variables cuantitativas empleadas en el estudio y su nominación abreviada.

Variable	Nominación		
	Momento inicial	Al año de seguimiento	Gradiente
Antropométricas:			
Circunferencia media del Brazo, cm	CB1	CB2	GCB
Pliegue Tricipital, mm	PT1	PT2	GPT
Perímetro de la cintura, cm	PC1	PC2	GPC
Índice Cintura-Cadera	ICC1	ICC2	GICC
Índice de Masa Corporal, Kg.m ⁻²	IMC1	IMC2	GIMC
Circunferencia Muscular del Brazo, cm	CMB1	CMB2	GCMB
Área Grasa del Brazo, cm ²	AGB1	AGB2	GAGB
Bioquímicas:			
Proteínas Totales, g.L ⁻¹	ProT1	ProT2	GProT
Albúmina, g.L ⁻¹	Alb1	Alb2	GAlb
Colesterol Total, mmol.L ⁻¹	Col1	Col2	GCol
Triglicéridos, mmol.L ⁻¹	Trig1	Trig2	GTrig
Transferrina, g.L ⁻¹	Trans1	Trans2	GTrans
Creatinina, μmol.L-1	Creat1	Creat2	GCreat
Inmunológicas:			
Conteo de Linfocitos T CD4+, células.mm ³	CD4 ₁	CD4 ₂	GCD4

En el estudio de seguimiento: Las variables del estudio fueron obtenidas a la inclusión del paciente en el estudio y al año de evolución.

Para cada variable se construyó el correspondiente gradiente de cambio. La expresión genérica para un gradiente cualquiera es $\frac{X_k - X_{k-1}}{X_{k-1}}$, donde X_k : valor de la k-ésima variable al año; y X_{k-1} : valor basal (léase también inicial) de la variable.

Los gradientes de cambio se utilizaron en los modelos de estudio de los posibles efectos de interacción y confusión mediante regresión logística binaria.

Los gradientes de cambio se hicieron depender del sexo y la edad del paciente, los años transcurridos del diagnóstico confirmativo del VIH+, y el grupo de pertenencia del sujeto. Las variables independientes se estratificaron y codificaron convenientemente para ingresarlos en la maquinaria de regresión logística binaria.

La selección de las variables nutricionales cuantitativas para el estudio de asociación por análisis multivariado se realizó mediante el test no paramétrico U de Mann Whitney,¹⁶⁻¹⁹ ante la ausencia de normalidad (comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov).¹⁴⁻¹⁵ Se compararon los valores centrales de las variables nutricionales cuantitativas en el primer momento del estudio y de sus respectivos gradientes tras un año de evolución, en los grupos definidos por la variable respuesta: Conteos CD4+ ≥ 350 vs. CD4+ < 350 células.mm⁻³ al año de seguimiento. Aquellas variables para las cuales la prueba U de Mann Whitney resultó significativa para un nivel de hasta un 15 %, fueron incluidas en el análisis multivariado como variables independientes.

Tabla 5. Variables cualitativas con la codificación asignada a los estratos para el procesamiento estadístico. *Leyenda:* Z: Variable ficticia que emula el grupo de pertenencia del sujeto con VIH/sida. Se asignó una variable Z para cada grupo.

Variable	Estratos	Codificación de las variables ficticias asociadas a los estratos
Sexo	M	0
	F	1
Edad del paciente	≤ 35 años	0
	> 35 años	1
Años transcurridos desde el diagnóstico confirmativo de VIH+	≤ 5 años	0
	> 5 años	1
Grupo de pertenencia del sujeto	Grupo I	Z ₂ = 0 Z ₃ = 0 Z ₄ = 0
	Grupo II	Z ₂ = 1 Z ₃ = 0 Z ₄ = 0
	Grupo III	Z ₂ = 0 Z ₃ = 1 Z ₄ = 0
	Grupo IV	Z ₂ = 0 Z ₃ = 0 Z ₄ = 1

Como método de análisis multivariado se utilizó la regresión logística binaria²⁰ a fin de medir la asociación entre las variables nutricionales y sus cambios relativos, respecto del conteo CD4 de la persona con VIH/sida. El modelo logístico empleado fue:

$$\text{Probabilidad (CD4}_2 < 350) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n)}} \quad [3]$$

La variable dependiente (léase de respuesta) del modelo logístico fue el conteo absoluto de los linfocitos T CD4+ en el segundo momento (CD4₂), a la conclusión del año de seguimiento. El conteo DC4+ se codificó como una variable binaria con valor cero si ≥ 350 ; y valor unitario para valores < 350 .

Se utilizó el método de selección por pasos para detectar en el conjunto de variables cuantitativas aquellas que mejor predijeron la respuesta. Se fijó un nivel de significación para la entrada de 0.15 y para la salida de 0.20. Posteriormente se ajustaron los modelos con la variable “grupos”: una variable categórica politómica con cuatro posibles respuestas (I, II, III, IV). A este fin, se construyeron tres (número de respuestas: -1) variables internas dicotómicas ficticias (léase también *dummy*) con valores (0, 1) y diferentes posibilidades de codificación, según se muestra en la Tabla 5. Se utilizó como nivel de referencia el Grupo I (No tratados con ARV + CD4 ≥ 350 células.mm⁻³).

La fuerza de la asociación entre las variables independientes y la variable de respuesta se identificó a partir de un parámetro de cuantificación de riesgo: la razón de disparidades (léase también *odds ratio*) y su intervalo de confianza.¹⁶⁻²⁰ La OR se obtiene del coeficiente β de las variables independientes del modelo logístico.²⁰ Si el coeficiente β de la variable es positivo, se obtiene un OR > 1 , lo que corresponde, por tanto, a un factor de riesgo. Por el contrario, si β es negativo, el OR < 1 , y se trata de un factor de protección.

Los modelos logísticos resultantes se examinaron adicionalmente para comprobar la veracidad de los mismos. El primer elemento que se consideró fue la tasa de clasificación correcta del modelo. Como segundo elemento de comprobación se tuvo en cuenta la exactitud de los modelos como herramienta para el diagnóstico, medida de la sensibilidad (S) y la especificidad (E). Se determinó en cada instancia, además, el valor predictivo del resultado positivo (VPP) y el valor predictivo del resultado negativo (VPN).

Para valorar la factibilidad de la ecuación logística como instrumento predictor se utilizaron las curvas ROC (por *Receiver Operating Characteristics*, o Características Operacionales del Receptor) que evalúan de forma conjunta la sensibilidad y la especificidad del modelo diagnóstico.²²⁻²³ Para detectar si los modelos tenían una calidad diagnóstica adecuada se docimó la hipótesis $H_0: A_{ROC} = 0.5$ vs. $H_1: A_{ROC} \neq 0.5$. A_{ROC} significa el Área bajo la curva ROC.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con los sistemas SPSS versión 20 (SPSS Inc., New York, Estados Unidos), EPIDAT versión 3.1 (CDC Centros para el Control de las Enfermedades, Atlanta, Estados Unidos) y MatLab (MathWorks, Estados Unidos), en dependencia de las necesidades de cálculo.

Para todas las pruebas estadísticas se consideró el 95% de confianza para denotar los eventos de interés como significativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez J, Pérez D, Gonzáles I, Díaz M, Millán JC, Orta M. Pautas cubanas para el tratamiento antirretroviral en pacientes con VIH/sida. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Ministerio de Salud Pública. Ciudad de la Habana: 2004.
2. Díaz ME. Manual de técnicas antropométricas para estudios nutricionales. INHA Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Ministerio de Salud Pública. La Habana: 2008.
3. Ospina S, Estrada S. Medidas de bioseguridad y SIDA. En: Fundamentos de Medicina. SIDA. Enfoque Integral. Segunda Edición. Editorial Interamericana. Medellín [Colombia]: 1996.
4. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, Hägele EO. Quantification of high density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl₂. *Clin Chem* 1983;29:2026-30.
5. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977;23:882-4.
6. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond WFPC, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
7. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
8. Waterlow JC. Classification and definition of protein-calorie malnutrition. *Br Med J* 1972; 3(826):566-9.
9. James WPT, Francois PJ. The choice of cut-off point for distinguishing normal body weights from under weight or “chronic energy deficiency” in adults. *Eur J Clin Nutr* 1994;48(S3): 179-84.
10. WHO Working Group. Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. *Bulletin WHO* 1986;64:929-41.
11. Chang RW. Nutritional assessment using a microcomputer. 1. Program design. *Clin Nutr* 1984;3:67-73.

12. Chang RW, Richardson R. Nutritional assessment using a microcomputer. 2. Programme evaluation. *Clin Nutr* 1984; 3:75-82.
13. Polo R, Gómez-Candela C, Miralles C, Locutura J, Álvarez F; *et al.* Recomendaciones de SPNS/GEAM/SENPE/AEDN/SEDCA/GESIDA sobre nutrición en el paciente con infección por VIH. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones. Madrid: 2006. Disponible en: http://www.gesida-seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/DcyRc_RecomendacionesNutricionVIHSep_2006.pdf. Fecha de última visita: 21 de Diciembre del 2012.
14. Kolmogorov A. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. *G Inst Ital Attuari* 1933;4:83.
15. Smirnov NV. Tables for estimating the goodness of fit of empirical distributions. *The Annals of Mathematical Statistics* 1948;19:279.
16. Moore DS, Cabe GP, Craig, BA. Introduction of the practice of Statistics. Sexta Edición. WH Freeman Publishing House. New York: 2009.
17. Triola MF. Elementary Statistics Technology Update. Eleventh Edition. Addison-Wesley. New York: 2012.
18. Santana Porbén S, Martínez Canalejo H. Manual de Procedimientos Bioestadísticos. Segunda Edición. EAE Editorial Académica Española. ISBN-13: 9783659059629. ISBN-10: 3659059625. Madrid: 2012.
19. Santana Porbén S, Martínez Canalejo H. Manual de Estadísticas no Paramétricas. Editorial Publicia. Saarbrücken: 2013. ISBN: 978-3-639-55468-7.
20. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. En: Wiley Series in Probability and Statistics. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken [New Jersey]: 2005.
21. Castro KG, Ward JW, Slutsker L, Buehler JW, Jaffe HW, Berkelman RL; for the Division of HIV/AIDS of the National Center for Infectious Diseases. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity Mortality Weekly Review* 1993;41(RR-17). Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>. Fecha de última visita: 19 de Noviembre del 2012.
22. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561-77.
23. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic test. *Preventive Veterinary Medicine* 2000; 45:23-41.