

GUIA PARA LA PRACTICA

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos
Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Márquez"

LA CITOLOGIA DE IMPRESION CONJUNTIVAL EN EL DIAGNOSTICO DE LAS DEFICIENCIAS DE VITAMINA A

Dr. Evelio Moreira Díaz¹ y Dr. Abiel Orrego Marrero²

RESUMEN

La citología de impresión conjuntival es una prueba basada en el efecto del retinol sobre la maduración y diferenciación de los epitelios. Se sabe que la deficiencia de la vitamina A conduce a la pérdida gradual, progresiva y reversible de las células caliciformes de la conjuntiva bulbar, y provoca la aparición secundaria de células epiteliales planas alargadas. Las muestras citológicas se toman por el contacto de un pequeño fragmento de papel de filtro miliporo con la conjuntiva. Sobre la base de las características del material obtenido se clasificó el citograma en 4 categorías: normal, alterado ligeramente, alterado y muy alterado. Esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad aceptable, con la ventaja de su bajo costo de operación, simplicidad y compatibilidad de realizarse con facilidades convencionales existentes en las áreas hospitalarias. Otras ventajas adicionales están determinadas por la obtención no traumática de los especímenes, fácil traslado, y almacenamiento por tiempo indefinido a temperatura ambiente.

Palabras clave: DEFICIENCIA DE VITAMINA A/ diagnóstico; CONJUNTIVA/ citología; TECNICAS CITOLOGICAS.

INTRODUCCION

Uno de los problemas nutricionales más graves e importantes que afectan a la humanidad en particular a los niños

preescolares de los países pobres es la deficiencia de vitamina A.

La hipovitaminosis A no es sólo un problema de los países en desarrollo, pues su aparición no está exclusivamente

¹ Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de I Grado en Anatomía e Histología Patológica. Profesor Titular. Laboratorio de Patología Experimental. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

² Especialista de II Grado en Anatomía e Histología Patológica. Profesor Auxiliar. Departamento de Patología. Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Márquez".

relacionada con la disponibilidad de alimentos, sino que se presenta en cualquier situación en la cual la ingesta dietética o la absorción sea inadecuada para la demanda metabólica. Datos recientes sugieren que las deficiencias de vitamina A tienen un profundo impacto en la morbilidad pediátrica general,¹ mortalidad,^{2,3} crecimiento,⁴ hematopoyesis⁵ y reactividad del sistema inmunitario.^{6,7} Aun las deficiencias subclínicas poseen importantes implicaciones para la salud y la sobrevivencia.³

Dadas las notables influencias para la salud de las deficiencias de vitamina A, en particular para los niños, los investigadores buscan métodos para la detección de la hipovitaminosis en estadios muy tempranos, ya que los niveles séricos en estas condiciones son muy poco sensibles.⁸ Se han desarrollado técnicas para evaluar indirectamente las reservas hepáticas como la dosis de respuesta relativa,⁹ pero éstos son métodos bioquímicos complejos y en determinadas circunstancias las muestras de sangre tienen el riesgo de transmitir infecciones. Aun más las reservas hepáticas pueden no representar verdaderamente las existencias corporales en las deficiencias,¹⁰ además de ser pruebas agresivas como es el caso de las biopsias de este órgano.

El diagnóstico de las deficiencias de vitamina A al nivel de la comunidad y de casos clínicos, requiere de una técnica simple, económica, sensible y de fácil generalización.

En 1984 se propuso por Hatchel y Sommet¹¹ la aplicación de un método citológico como una prueba simple y objetiva para la detección temprana de las deficiencias de vitamina A, al que se ha llamado citología de impresión conjuntival (CIC). Estos investigadores observaron que en los conejos la depleción progresiva de la vitamina A, produce la reducción gradual de las células caliciformes, con cambios morfológicos en las células epiteliales, y que dichas

modificaciones ocurren antes de que aparezcan los signos clínicos de las deficiencias.

La CIC se ha convertido en los últimos 5 años en uno de los principales métodos diagnósticos del estado nutricional de vitamina A en grupos poblacionales, pero su uso ha quedado retrasado como prueba clínica en la evaluación individual de pacientes. Su bajo costo de operación y sus posibilidades de realización con mínimos recursos hacen a esta técnica, de las hasta ahora conocidas, la más factible de emplear en los países en vías de desarrollo.

Este artículo tiene el propósito de divulgar las características de este método y alertar sobre sus posibilidades de empleo, en niños donde el estado clínico haga sospechar la deficiencia de vitamina A y sea necesario una prueba diagnóstica confirmatoria.

ESTADO ACTUAL EN LA APLICACION DE LA CIC

En 1983 Sommer et al.¹² comunicaron que los especímenes biopsicos conjuntivales de niños con deficiencias ligeras de vitamina A, revelan metaplasia generalizada a través de la superficie de la conjuntiva bulbar. En 1984 Hatchell y Sommer¹¹ reportan la aparición de cambios citológicos conjuntivales tempranos, en conejos con dietas deficientes de vitamina A.

La primera comunicación sobre el uso clínico de la CIC fue el realizado por Wittepen en 1986,¹² quien informa su empleo en la detección temprana de las deficiencias de vitamina A, en un estudio realizado en 32 niños preescolares. Otro trabajo de interés fue el publicado por Manesme et al. en Francia en 1988,¹³ donde evalúan a 17 niños con enfermedad hepática grave con ojos clínicamente normales; correlacionan el retinol plasmático y la concentración hepática, y observan que todos los niños

con estado deficiente de vitamina A presentan el examen citológico anormal, a pesar de la aparente salud conjuntival.

En 1989 C. Carlier et al.¹⁴ comparan los resultados de la CIC con parámetros de retinol séricos y de dosis respuesta relativa (DRR) en 100 ancianos, y concluyen que la CIC es una prueba indicadora de la deficiencia sérica de vitamina A. Ese mismo año Gadonski et al.¹⁵ realizan un estudio en 213 niños de zonas periféricas de Ciudad de Guatemala, y registran que la CIC no identifica el mismo grupo de niños con estado marginal que las pruebas bioquímicas. Este es hasta ahora el resultado más adverso sobre la sensibilidad de la CIC, el cual además se contrapone a los otros estudios.

Reddy en 1989,¹⁶ investiga a 241 niños y concluye que las alteraciones citológicas reflejan adecuadamente las deficiencias subclínicas, y que la CIC puede ser útil en comunidades donde la prevalencia de xeroftalmia es baja.

En 1990 Cañete et al.¹⁷ realizan en España una investigación, en la cual encuentran en 41 niños correspondencia del 100 % entre los niveles séricos y los resultados citológicos.

En 1991 Usha¹⁸ investiga en la India a 23 niños con diarrea persistente sin manifestaciones de xeroftalmia, y encuentra que la CIC tiene en estos casos una alta correlación con los niveles séricos, por lo que considera la prueba útil para el control de la vitamina A en niños con diarrea crónica.

Khan et al. en Bangladesh en 1992¹⁹ estudian a 22 casos y encuentran una sensibilidad del 100 % con niveles séricos por debajo de 10 $\mu\text{g/dL}$. Tanomihardjo et al. en 1991,²⁰ comparan la CIC con el *test* de DRR y registran que los patrones citológicos de la CIC coinciden perfectamente con los resultados de esta prueba. Udomkesmalee en 1992,²¹ en Tailandia, estudia a 133 niños con niveles marginales de retinol plasmáticos y registra que la CIC tiene con éstos una alta correlación.

El trabajo más reciente y con un mayor número de casos que hemos consultado es el realizado en 1992 por Carlier et al.²² quienes evalúan una muestra de 1 445 niños y concluyen que la CIC es un buen indicador de las deficiencias de vitamina A, y que la prueba puede ser empleada en los estudios de prevalencia.

UNIVERSO DE APLICACION DE LA CIC

Los métodos disponibles para diagnosticar las deficiencias de vitamina A pueden ser clasificados en 4 categorías: clínicos, bioquímicos, funcionales y dietéticos. El diagnóstico clínico se basa en el examen ocular y extraocular, para determinar los síntomas de hipovitaminosis A, pero sólo detectan casos graves.

Otras pruebas como la evaluación funcional de ceguera nocturna, y la utilización de colorantes sobre la conjuntiva como la rosa de Bengala y la alizarina, son poco precisos e identifican la situación en etapas tardías, y de lo que se trata es de reconocer deficiencias subclínicas.

Los métodos dietéticos están fundados en la estimación de la ingesta de vitamina y carotenoides. Además existen otros procedimientos como la dilución isotópica y la reacción a dosis de DRR. La DRR es una prueba sensible para evaluar indirectamente las reservas hepáticas, pero tiene grandes problemas logísticos en los estudios de terreno, y hasta en los propios medios hospitalarios, pues requiere de 2 extracciones de sangre en un intervalo de 5 horas, posterior a la administración de 0,480 mg de palmitato de retinol, con todo el proceso de laboratorio consiguiente y los inconvenientes de estadía del sujeto en el hospital.

La investigación del estado individual de la vitamina A, con métodos bioquímicos, queda en el momento

actual fuera de la práctica de la asistencia médica, entre otras razones, por los altos costos de reactivos. Esto conduce a que el diagnóstico de una deficiencia de vitamina A sea presuntivo, tomando como referencia una evaluación dietética, la mayor parte de las veces superficialmente realizada, o el padecimiento de una enfermedad que interfiere la absorción de la misma; en dicha situación el solo hecho de la consideración del problema conduce en la práctica a la prescripción de la vitamina, sin contar las veces en que se emplea como un curalotodo. Lo anterior conduce a gastos innecesarios del paciente o de los servicios de salud.

Los requerimientos mencionados limitan el monitoreo del estado de vitamina A en las comunidades o la sistematicidad del diagnóstico individual durante el manejo de un caso clínico, a través de un procedimiento objetivo de laboratorio.

Las técnicas bioquímicas no sólo son caras, sino también tienen dificultades como indicadores biológicos. La concentración de retinol plasmático -la prueba hasta ahora más usada-, además de sus inconvenientes logísticos y operacionales, es influida por varias situaciones clínicas, y no puede ser considerada un indicador preciso de las reservas de la vitamina, a menos que esté por debajo de $10 \mu\text{g/dL}$. Tiene además, según el comité de expertos FAO/OMS/1991,²³ la limitación "...que en algunos individuos tanto adulto como niños, las concentraciones plasmáticas del retinol, superiores a $20 \mu\text{g/dL}$ pueden estar asociadas con una nutrición insuficiente con respecto a la vitamina A."

En general, las determinaciones séricas de vitamina A poseen significativos problemas en las condiciones del trabajo de terreno y en la evaluación del estado individual. Se plantea que los mayores inconvenientes están dados por el carácter traumático de la venopuntura, con todos los problemas infectocon-

tagiosos vinculados a la manipulación masiva de muestras de sangre, el transporte y almacenaje, el que tiene que ser realizado en cámaras frías por debajo de los 15°C , y con un tiempo limitado de conservación. Requiere además de reactivos caros, costosos equipos y personal especializado. La consecuencia práctica de todo esto es que salvo muy raras excepciones, nuestra red de hospitales no tiene la posibilidad de contar con un método que posibilite a los médicos evaluar el *estatus* de la vitamina en enfermos, donde las alteraciones clínicas demanden de una investigación confirmatoria.

PROCEDIMIENTOS TECNICOS

A) TOMA DE LA MUESTRA CONJUNTIVAL

La toma del material citológico requiere como soporte el empleo de un fragmento de papel de filtro miliporo de acetato de celulosa de tamaño de poros fluctuante entre $0,20$ y $0,40 \mu\text{m}$ de diámetro.

El filtro miliporo se corta en pequeñas tiras de 5 por 10 mm. Para la toma de la muestra el papel se sostiene con una pinza por un extremo, y se hace contactar el otro con la conjuntiva bulbar del cuadrante temporal (figura 1). La parte del papel que es asida por la pinza debe ser colocada hacia la comisura palpebral, y el otro extremo hacia la córnea; especial cuidado hay que observar en no poner en contacto el papel con el limbo, pues recuerde que en la unión esclerocórnea se produce la transición del epitelio y si se toman sus células éstas serán planas y pueden ser interpretadas erróneamente como células metaplásicas en las evaluaciones citológicas de los especímenes.

Tras esperar 2 ó 3 segundos se retira el papel. Algunos autores recomiendan presionar suavemente con el

mango de una pinza, o con cualquier objeto romo sobre el dorso del papel, una vez adosado a la conjuntiva, lo que aumenta la eficacia en la toma de material citológico. En nuestra experiencia un simple y delicado contacto, es suficiente para la obtención del material. Debe evaluarse una muestra de cada ojo para el estudio integral del paciente. Para indicar a qué ojo corresponde la muestra, se le hace una pequeña muesca al papel, o cualquier otra marca que convencionalmente identifique el lado al que pertenece.



FIGURA. Representación esquemática de la colocación de la tira de papel de filtro miliporo en la conjuntiva bulbar. Note que éste debe contactar separado, no menos de 5 mm del limbo esclerocórneo.

Las mayores dificultades para la toma de las muestras se presentan en los niños menores de 3 años, edades en que las deficiencias de la vitamina A son más importantes. En estos casos se pide al acompañante que sostenga al niño entre los brazos, o lo acueste entre las piernas. Mientras se distrae al niño, desde el lado opuesto al ojo que se muestra para que incline el ojo y deje expuesta la conjuntiva temporal, con una

tira de panel de filtro cortada más larga de unos 3 cm, sostenida directamente entre los dedos índice y pulgar (lo que asusta menos al niño y disminuye el riesgo de accidente), tan rápido como sea posible se coloca el extremo de ésta sobre la conjuntiva y separa antes que pueda pestañear o realizar movimientos oculares. Las muestras se sumergen inmediatamente en el líquido fijador.

B) PROCESO DE LABORATORIO

El líquido fijador consiste en una solución de alcohol etílico al 70 %, formaldehído al 37 % y ácido acético glacial en relación de volúmenes de 20:1:1. En esta solución puede permanecer la muestra por tiempo indefinido. El tiempo mínimo de fijación para iniciar el proceso de coloración es de 10 minutos.

De los métodos de coloración que se han propuesto, nosotros seguimos el originalmente descrito en el Instituto Wilmer,¹¹ al que hacemos pequeños ajustes de acuerdo con el tipo de papel de filtro y la reactividad del Schiff en uso (tabla 1). Los especímenes una vez teñidos y deshidratados se colocan en xilol por lo menos 20 minutos, a fin de aumentar la transparencia del papel y facilitar la lectura. El fragmento de papel se monta en el cristal portaobjetos con bálsamo del Canadá, como si se tratara de un tejido.

Un grupo de investigadores del hospital BICETRE en París,²⁴ recomiendan un método al que llaman impresión citológica con trasferencia, que según ellos es más simple, pues reduce considerablemente los pasos técnicos. En este método las células colectadas sobre la tira de papel, son inmediatamente transferidas al portaobjetos por presión digital sobre el dorso del papel, cuya cara con el material citológico contacta con el cristal. En este portaobjeto se colocan las muestras de ambas conjuntivas, las que se introducen no menos de 15 minutos en la solución fijadora que contiene

ne una mezcla de alcohol al 95 % y la solución de coloración (coloración de un solo paso). La coloración comprende 1 volumen de carbol fucsina y 2 volúmenes al 0,2 % de azul de alcian en ácido acético, al 5 % (solución de Ziehl Neelsen). El tiempo de coloración fluctúa alrededor de 10 minutos. Se lava el portaobjetos con agua corriente y se deja secar al aire.

TABLA 1. Técnica de coloración

Solución	Tiempo
Agua corriente	3 minutos
Acido periódico	2 minutos
Reactivo de Schiff diluido en agua destilada (1:3)	2,5 minutos
Agua corriente	2 minutos
Hematoxilina de Harris	10 segundos
Agua corriente	Varios pases hasta que el agua aclare
Etolol al 80 %	2 minutos
Etolol al 95 %	2 minutos
Etolol absoluto	2 minutos

Nota: Mantener por lo menos 20 minutos en xilol antes del montaje.

Creemos que esta técnica tiene sus inconvenientes mayores, porque consta de pasos inmediatos no interrumpibles, lo que en la práctica le introduce más complejidades que la simplicidad operacional que supuestamente tiene.

C) INTERPRETACION DEL CITOGRAMA

El estado de la vitamina A se determina de acuerdo con la presencia de células caliciformes, y la morfología de las células epiteliales superficiales.

En las deficiencias de vitamina A las células caliciformes desaparecen de los citogramas, al ser sustituidas por células planas (metaplasia escamosa). Son por lo tanto, el elemento básico que se tendrá en cuenta en la evaluación diagnóstica. Las células planas se tornan agrandadas y aisladas, y transforman el

aspecto citológico general de la conjuntiva, el que toma en las deficiencias graves de la vitamina un aspecto de frotis vaginal.

Se han descrito varios citogramas diagnósticos, la mayor parte de ellos divide los cambios reconocibles en 4 etapas, las que se han denominado de manera diversa. En nuestros laboratorios usamos el esquema que aparece en la tabla 2, en la cual hemos integrado criterios de varios autores.^{15,22} El problema fundamental consiste en lograr que cada estadio de la deficiencia, sea citológicamente reconocible con sus límites de clase bien definidos. En nuestro esquema damos mucha importancia a la evaluación de las células epiteliales agrandadas y a la tendencia al aislamiento y separación que ellas evidencien.

Debe tenerse en cuenta al valorar citogramas conjuntivales, sobre todo de adultos, que existen varias enfermedades primarias de la superficie ocular como la queratoconjuntivitis seca, el síndrome de Stevens Johnson y el penfigoide oftálmico, entre otras afecciones que presentan alteraciones celulares confundibles con las ocasionadas por déficit de vitamina A. Alteraciones en que la CIC puede ser también empleada para valorar la respuesta terapéutica.²⁵

En nuestra experiencia con un adecuado entrenamiento, se pueden distinguir con precisión las 4 etapas de la clasificación que usamos. Las potencialidades de la CIC están determinadas, fundamentalmente, por la capacidad científica de quien la emplea de vincular alteraciones citológicas a la dinámica del metabolismo de la vitamina A, pues los estadios diagnósticos de nuestro citograma, como de cualesquiera de los otros descritos en la literatura, son etapas de un proceso dinámico dividido artificialmente, para inferir de la respuesta histica conjuntival la potencialidad de la reserva hepática de mantener los niveles séricos óptimos en diferentes condiciones de ingesta y demanda funcional.

TABLA 2. Citograma diagnóstico

Estadio clínico	Mucus	Células caliciformes	Células epiteliales
Normal	Abundante > 50 % de la superficie de la muestra	Abundantes y fácilmente identificables	Grandes masas compactas de células pequeñas
Alterado ligeramente	Abundante > 25 % de la superficie de la muestra	Escasas y atróficas	Predominan las células pequeñas y se mantienen agrupadas Escasas células agrandadas generalmente aisladas
Alterado	Ausente	Ausentes	No aparecen células pequeñas, sólo hay agrandadas Las células están separadas Poca densidad celular Variabilidad tinte del citoplasma
Muy alterado	Ausente	Ausentes	Células agrandadas y alargadas, muy escasas y aisladas Pueden aparecer gránulos citoplasmáticos

SUMMARY

The conjunctival impression cytology is a test based on the effect of retinol on epithelium maturation and differentiation. It is known that vitamin A deficiency produces the gradual, progressive and reversible loss of the caliciform cells of the bulbar conjunctiva and provokes the secondary appearance of flat elongated epithelial cells. Cytological samples are taken by making contact with the conjunctiva with a small piece of filter paper. Based on the characteristics of the obtained samples, cytograms are classified in four categories: normal; slightly altered; altered; and very altered. This test has an acceptable accuracy and specificity. Its advantages are: low cost; simplicity; and compatibility to be carried out in the conventional facilities of hospital institutions. There are other additional advantages: the taking of samples is non traumatic; they can be easily transported and can be stored at environment temperatures for indefinite periods of time.

Key words: VITAMIN A DEFICIENCY/ diagnosis; CONJUNCTIVA/ cytology; CYTOLOGICAL TECHNIQS.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Sommer A, Tarwotjo T, Hussaini G. Incidence, prevalence and scale of blinding malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1984;40:1090-5.
- Pawia WW. Vitamin A supplementation and child mortality: a meta-analysis. *Am Med Assoc* 1993;269:898-903.
- MacTaren DS. Vitamin A and entrapment. *Xerophthalmia Club Bull* 1991;53:1-2.
- West KP. Vitamin A supplementation and growth: randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1257-64.

5. Mejia IA, Chew F. Hematological effect of supplementing vitamin A alone and in combination with iron to anemic children. *Am J Clin Nutr* 1990;46:234-45.
6. Ross CA. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:303-20.
7. Bates C. Vitamin A and infant immunity. *Lancet* 1993;341:28-9.
8. Detecting vitamin A deficiency early. [Editorial] *Lancet* 1992;339:20-1.
9. Tanumihardjo SA. Assessment of vitamin A status in preschool age Indonesian children by modified relative dose response. *Am J Clin Nutr* 1990;52:1064-7.
10. Blomhoff R, Green MH. Vitamin A metabolism: new perspective on absorption, transport and storage. *Physiol Rev* 1991;71:751-90.
11. Hatchel DT, Sommet A. Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency. *Arch Ophthalmol* 1986;102:1389-93.
12. Wittepen JR, Tseng S, Sommer A. Detection of early xerophthalmia by impression cytology. *Arch Ophthalmol* 1986;104:237-9.
13. Amedee-Manesme O, Luzeau R, Wittepen JR, Hanck A. Impression cytology detects subclinical vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 1988;47:875-8.
14. Carlier C, Mourey M, Luzeau R, Ellioud T, Amedee-Manesme O. Assessment of vitamin A status in an elderly French population using impression cytology with transfer. *Int J Vitam Nutr Res* 1989;59(1):3-7.
15. Gadomski A, Hjolhde C, Wittepen J, Rulux J, Rosas R, Forman MR. Conjunctival impression cytology (CIC) to detect subclinical vitamin A deficiency: comparison of CIC with biochemical assessments. *Am J Clin Nutr* 1989;49:495-500.
16. Redy V, Rao V, Aunijothi R, Reddy M. Conjunctival impression cytology for assessment of vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 1989;50(4):814-17.
17. Cafete A, Codoceo R, Carvalho T, Jara P. Nuestra experiencia con el test de impresión citológica para detectar deficiencias de vitamina A en niños. *An Esp Pediatr* 1990;32(2):139-42.
18. Usha N, Sankanarayanan A, Walia BN. Assessment of preclinical vitamin A deficiency in children with persistent diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;13(2):168-5.
19. Khan AN, Huda S, Ahmed AN, Hossain T, Sultana N. Detection of early xerophthalmia by impression cytology and rose bengal staining: a comparative with conjunctival impression cytology (CIC). *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1992;18(1):1-11.
20. Tanumihardjo SS, Olson JA. The reproducibility of the modified relative dose response (MRDR) assay in healthy individual over time and its comparison with conjunctival impression cytology (CIC). *Eur J Clin Nutr* 1991;45(3):407-11.
21. Odomkesmalee E, Dhanamitta S, Sirisnhas S. Effects of vitamin A and zinc supplementation on the nutrition of children in northeast Thailand. *Am J Clin Nutr* 1992;56(1):50-7.
22. Carlier C, Coste J, Etchepore M, Amédée-Manesme O. Conjunctival impression cytology with transfer as a field applicable indication of vitamin A status for mass screening. *Int J Vitam Nutr Res* 1988;58:166-70.
23. FAO/OMS. Necesidades de vitamina A, folatos, hierro y vitamina B12: informe FAO/OMS. FAO, 1991.
24. Luzeau R, Carlier C, Ellrot O, Amédée-Manesme O. Impression cytology with transfer: an easy method for detection of vitamin A deficiency. *Int J Vitam Nutr Res* 1988;58:166-70.
25. Daniel J, Nelson MD. Cellulose acetate impression of the ocular surface. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1886.

Recibido: 6 de diciembre de 1993. Aprobado: 6 de diciembre de 1993.

Dr. *Evelio Moreira Diaz*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Infanta 1158, La Habana 10300, Ciudad de La Habana, Cuba.