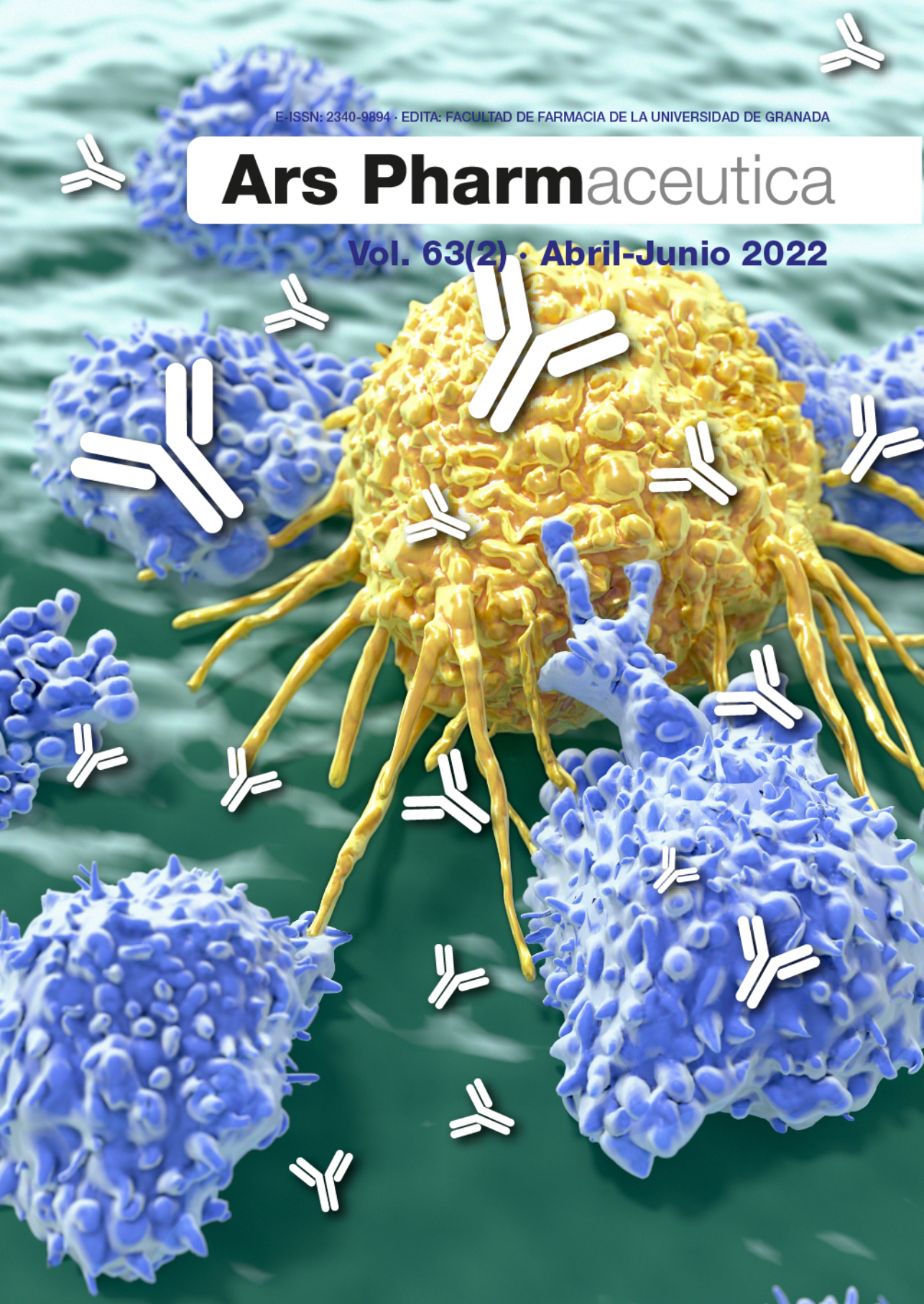


E-ISSN: 2340-9894 · EDITA: FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Ars Pharmaceutica

Vol. 63(2) · Abril-Junio 2022



E-ISSN 2340-9894

Ars Pharmaceutica es una revista científica de carácter multidisciplinar, en el ámbito de las Ciencias Farmacéuticas en su sentido más amplio, con especial énfasis en la Tecnología y Química Farmacéutica, Farmacología, y Atención Farmacéutica. Ha sido pionera en España en estas disciplinas, editada por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada desde 1960 de manera ininterrumpida. Durante este tiempo se ha ido adaptando a la evolución de la mayoría de las revistas científicas, en la que se ha pasado de su publicación en papel a convertirla en una revista electrónica de libre acceso. Esto ha supuesto una mayor accesibilidad de investigadores de todos los países a la publicación, lo que se ha podido comprobar por el número de visitas recibidas en la web y un interés por publicar sus trabajos en ella. El hecho de aceptar trabajos en español o inglés indistintamente, también ha contribuido a aumentar el número de originales recibidos en la última década.

Actualmente se encuentra indexada en las siguientes bases de datos/directorios/repertorios: EMERGING SOURCE CITATION INDEX (ESCI), EBSCO, EMBASE, DIALNET, DOAJ, GOOGLE ACADEMICO, LATINDEX, REDIB, SCIELO, IBECS, MIAR y es nuestra intención aumentar su presencia en otras bases. Se han establecido las distintas categorías de trabajos que se pueden publicar. Para agilizar el envío de originales a través de la web se ha desarrollado un sistema electrónico de envío. Se han habilitado recursos humanos y económicos, que nos permiten ofrecer la revista en formato electrónico y de forma gratuita a todos los científicos y profesionales interesados.

La revista se alinea con la Open Access Journal y los artículos que se publican lo hacen según los términos de la licencia Creative Commons 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) desde 2018. Ars Pharmaceutica no cobra tasas por el envío de trabajos, ni por la publicación de sus artículos.

Esta revista es el órgano de expresión de la “Cátedra Maria José Faus Dader de Atención Farmacéutica”, desde 2012.

En el año 2021 se le ha renovado el sello de calidad editorial otorgado por la FECYT, por un periodo de tres años y ha entrado en el nuevo índice de impacto JCI (Journal Citation Indicator), lo que ha supuesto estar dentro de las 357 revista del mundo en el campo de la Farmacología y la Farmacia, recogidas en los JCR de la Web of Science. Por ello desde aquí invitamos a todos los autores a enviar sus aportaciones a las distintas secciones de la revista.

Contacto de la Redacción

Editorial Office Contact Info

Ars Pharmaceutica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.
Campus de Cartuja s/n.
18071 -Granada. España
email: ars@ugr.es

Edita

Scientific Editor

Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

Publica

Publisher

Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada
Campus de Cartuja, s.n.
18071 - GranadaEspaña | Spain

Toda la información sobre la revista en
More info about the journal available on

Equipo Editorial

Directores Honoríficos:

Dr. Jesús Cabo Torres, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España
Dra. María José Faus Dáder, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España
Dr. Fernando Martínez-Martínez, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Director

Dr. Manuel Sánchez Polo, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Editora

Dra. María Dolores Ruiz-López, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Coordinadores de área

Atención Farmacéutica

Dr. José Pedro García Corpas, Cátedra Atención Farmacéutica, Univ. de Granada, España

Estudios clínicos

Dra. Carmina Wanden-Berghe, Hospital General de Alicante, España

Farmacia Clínica

Dr. Miguel Ángel Calleja, Farmacia Hospitalaria. Hospital Virgen de las Nieves. Granada, España

Legislación y Gestión farmacéutica

Dra. María Dolores Cabezas López, Farmacia Asistencial, social y Legal. Universidad de Granada. España

Microbiología Clínica

Dra. Belén Juárez Jiménez, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Química Farmacéutica

Dr. Joaquín María Campos Rosa, Química Farmacéutica y Orgánica Univ. Granada, España

Radiofarmacia

Dr Antonio Matilla, Química Inorgánica, Radiofarmacia. Univ. de Granada, Granada, España

Salud

Dra. Reyes Artacho. Nutrición y Bromatología. Universidad de Granada. Granada. España

Tecnología Farmacéutica

Dra. Beatriz Clares Naveros, Tecnología Farmacéutica. Univ. de Granada, España

Consejo Asesor

Dr. Pedro Amariles, Farmacia Clínica. Univ. de Antioquia, Colombia

Dr. Shalomn Isaac Benrimoj, Pharmacy Practice. Univ. Tecnología Sydney, Australia

Dr. Jesús Culebras, Real Academia de Medicina y Cirugía Valladolid. Univ. de León, España

Dr. Fernando Fernández-Llimós, Farmacia Social. Univ. de Lisboa, Portugal

Dr. Tomas de Haro, Análisis Clínico. Hosp. Clínico San Cecilio. Granada, España

Dr. Eduardo Luis Mariño, Unidad Farmacia Clínica. Univ. de Barcelona, España

Dra. Lucrecia Moreno, Farmacología. Univ. CEU Cardenal Herrera. Valencia, España

Dr. José Cristian Plaza-Plaza. Facultad de Química y de Farmacia. Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda. Univ. Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México

Dr. José Luis Quiles, Fisiología, Univ. de Granada. España

Dr. Antonio Rabasco, F y Tecnología Farmacéutica. Univ. de Sevilla, España

Dra. María del Carmen Ramírez Tortosa, Bioquímica y Biología molecular. Universidad de Granada, España

Dr. Alan Joel Ruiz Padilla. Farmacia Asistencial. Universidad de Guanajuato. México

Dr. Daniel Sabater, Pharmacy Practice. Univ. Tecnología Sydney, Australia

Dr. Javier Sanz, Salud Pública e Historia de la Ciencia. Univ. Miguel Hernández. Elche, España

Sumario Contents

Editorial / Editorial

- 111-113 **MANUEL SÁNCHEZ POLO**
Carta del Director
Letter from the Director

Artículos Originales / Original Articles

- 114-125 **PAMELA BERTOLDO, MARÍA BELÉN BRASSIOLO, LUIS MARÍA ALVAREZ VALDÉS**
Alfabetización en la salud en pacientes con prescripción de hipolipemiantes: una mirada desde la atención primaria
Health literacy in patients with lipid-lowering prescription: a view from primary care
- 126-131 **CELIA CASTAÑO-AMORES, PELAYO NIETO-GÓMEZ**
Fumarase deficiency: a difficult diagnosis and a challenging treatment approach
Déficit de fumarasa: un difícil diagnóstico y abordaje terapéutico
- 132-143 **DÉBORA CARVALHO RADICCHI, ANDRÉ SACRAMENTO MELO, ANA PAULA BRAGA LIMA, TAMIRES CUNHA ALMEIDA, GUSTAVO HENRIQUE BIANCO DE SOUZA, GLENDA NICIOLI DA SILVA**
Naringin: antitumor potential in silico and in vitro on bladder cancer cells
Naringina: potencial antitumoral in silico e in vitro en células cancerosas de vejiga
- 144-151 **CARLOS FUENTES-SENISE, FRANCISCO JAVIER FERREIRA ALFAYA, MARIA ELENA SENISE-GÓMEZ, YASMIN CURA**
Estudio exploratorio de la participación en proyectos de investigación en Farmacias Comunitarias
Patient participation in research projects in Community Pharmacies: An exploratory study

- 152-165 DELGADO-GÓMEZ BALBINA S, LÓPEZ-ESPINOSA NADIA L, CASTRO-BEAR VERONICA, ZUÑIGA-LEMUS OSCAR
Validation of three analytical methods for quantification of acetaminophen by UV spectrophotometry
Validación de tres métodos analíticos para cuantificación de acetaminofén mediante espectrofotometría UV

Originales breves/ Short Articles

- 166-172 CARRERA-HUESO FRANCISCO JAVIER, ALVAREZ-ARROYO LAURA, ROBUSTILLO-VILLARINO MONTSE, PÉREZ-OLASO, ÓSCAR, EL-QUOTOB DAVID, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ FERNANDO
Use of Tocilizumab in hospitalized patients during the first wave of the COVID-19 pandemic
Uso de tocilizumab en pacientes hospitalizados durante la primera ola de la pandemia COVID-19

Notas clínicas / Clinical Notes

- 173 JAIME ANDRÉS BONILLA-PLAZA, MARÍA HILDA GARCÍA-RUIZ, LAURA BAZ-SANZ, PAZ AZPEITIA-HERNÁNDEZ, ROSA MARÍA CASTRO-VELASCO, JUAN ANTONIO PÉREZ-IRUELA
Dolor lumbar persistente tras la administración de [¹³¹I]odo-6-β-iodometil-19-norcolesterol: a propósito de un caso
Lower back pain after iodine-131-6-β-iodomethyl-19-norcholesterol injection: a case report

Artículos revisión / Review Articles

- 178-188 HILARIA M. GARCÍA-BIENES, CANDELARIA C. SÁNCHEZ-MATEO
Cimicifuga racemosa (L.) Nutt. en el tratamiento de los síntomas vasomotores de la menopausia: revisión.
Cimicifuga racemosa (L.) Nutt. in the treatment of vasomotor symptoms of menopause: a review.
- 189-203 CELESTE ORTEGA-MONGE, NOELIA ARCE-RODRÍGUEZ, MARIPAZ SANTAMARÍA-MUÑOZ, MARIANELA CHAVARRIA-ROJAS, MARÍA FERNANDA ROJAS SALAS, ELEANETH BALTODANO VIALES, GERMAN L. MADRIGAL REDONDO
Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina
Nanoantibodies applications in medicine

doi: 10.30827/ars.v63i2.24071

Editorial

Carta del Director

Letter from the Director

Manuel Sánchez Polo¹  0000-0002-7802-6505

¹Decano Facultad de Farmacia Farmacéutica Universidad de Granada. Granada. España

Correspondencia

Manuel Sánchez Polo
mansanch@ugr.es

Recibido: 02.03.2022
Aceptado: 03.03.2022
Publicado: 21.03.2022

Financiación

No aplica

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de interés.

Agradecimientos

No aplica

Estimados lectores de la revista ARS Pharmaceutica,

Son ya más de 60 años desde que la revista ARS Pharmaceutica comenzó sus primeras publicaciones, y desde entonces el incremento en la calidad de los artículos así como la regularidad en sus publicaciones se ha mantenido como reto constante.

Nuestra revista ha sido liderada por los diferentes Equipos de Gobierno de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada desde su creación, donde con gran esfuerzo y dedicación se ha conseguido una estabilidad editorial incluso en las épocas más difíciles por limitaciones económicas, organizativas y de desarrollo. Durante todos estos años con fuerte dedicación, tesón y constancia se han perfeccionado algunos aspectos editoriales, se ha transformado en una revista digital de acceso abierto a toda la comunicad científica y se han mejorado los mecanismos de gestión en sintonía con los estándares y criterios nacionales e internacionales sobre publicaciones científicas. Estos avances han permitido la acreditación y consolidación de Ars Pharmaceutica en los diferentes indicadores internacionales, destacando su inclusión en repositorios como Scielo, Web of Science y Journal of Citation Reports. Así, recientemente Ars Pharmaceutica ha sido clasificada en el percentil Q4 según Journal Citation Indicator (JCI) en el área de “Pharmacology and Pharmacy”. Tengo la seguridad de que este último hecho marcará un antes y un después en la trayectoria de ARS Pharmaceutica.

Ars Pharmaceutica se ha ido posicionando entre la comunidad científica nacional e internacional como una revista de consulta sobre avances y resultados de investigación en todos los ámbitos relacionados con las ciencias farmacéuticas. El incremento en el número de autores externos e internacionales ha sido notable y progresivo en los últimos años, reflejo del interés y la motivación de los investigadores en publicar en nuestra revista, ha provocado en una mejora notable en sus índices de calidad.

El factor de impacto de las revistas depende esencialmente de la originalidad científica de los artículos publicados y de su posible repercusión social y científica, pero existen otros factores que pueden facilitar la citación de los artículos de nuestra revista y, por tanto, podrían contribuir a la mejora de sus indicadores en los diferentes rankings existentes. Por ello, motivados con este nuevo reto, y con la intención de conseguir que Ars Pharmaceutica sea más atractiva y se convierta en el medio preferido de comunicación y divulgación para los investigadores y profesionales en el área de las ciencias farmacéuticas, trabajaremos intensamente en los siguientes aspectos:

- i. Potenciar la publicación de reseñas de proyectos de investigación.
- ii. Incrementar las contribuciones de grupos de investigación nacionales e internacionales de gran impacto científico.
- iii. Difundir la revista en foros nacionales e internacionales potenciando su visibilidad.
- iv. Diseñar volúmenes especiales o números monográficos que aborden un tema concreto de gran actualidad, garantizando en todo momento la calidad científica exigible para su publicación en Ars Pharmaceutica.
- v. Recoger la publicación de aquellos documentos técnicos que se pudieran producir en relación con la profesión.
- vi. Facilitar el acceso de los investigadores de todos los países a su contenido científico mediante el establecimiento de acuerdos con asociaciones científicas y/o profesionales.

En resumen, nos encontramos en una etapa efervescente que, con el propósito compartido por todos, nos permitirá alcanzar con éxito el objetivo de que Ars Pharmaceutica sea una revista de gran prestigio en el área de las ciencias farmacéuticas a nivel nacional e internacional.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a todo el Equipo Editorial de Ars Pharmaceutica que, coordinado por las Profesoras M^a José Faus Dader, y M^a Dolores Ruiz López, así como por el Profesor Fernando Martínez Martínez han dirigido con éxito y alcanzado grandes logros para la revista durante los últimos años.

Un afectuoso saludo.

Manuel Sánchez Polo
Decano Facultad de Farmacia

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i2.23470

Artículos originales

Alfabetización en la salud en pacientes con prescripción de hipolipemiantes: una mirada desde la atención primaria

Health literacy in patients with lipid-lowering prescription: a view from primary care

Pamela Bertoldo¹  0000-0002-1447-2186

María Belén Brassiolo¹

Luis María Alvarez Valdés¹

¹Universidad Católica de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Córdoba, Argentina.

Correspondencia

Pamela Bertoldo
8703084@ucc.edu.ar , pamela.bertoldo@gmail.com

Recibido: 14.12.2021

Aceptado: 06.02.2022

Publicado: 21.04.2022

Agradecimientos

a la Dra Ana M Vázquez por su colaboración en el análisis estadístico de las variables.

Financiación

Secretaría de Investigación Universidad Católica de Córdoba.

Conflicto de intereses

No corresponde

Resumen

Introducción: La alfabetización en salud es una medida de la capacidad de los pacientes de leer, comprender y tomar decisiones en base a instrucciones médicas. La inadecuada alfabetización se asocia a un peor estado de salud en pacientes con enfermedades crónicas. El momento de la dispensación podría ser una oportunidad para evaluar esta condición por el farmacéutico de atención primaria

El objeto de este estudio fue evaluar la relación de alfabetización en salud y los valores de colesterol total y comorbilidades en personas con prescripción de hipolipemiantes atendidos en un centro de jubilados.

Método: Se diseñó un estudio prospectivo donde se evaluó la relación de la alfabetización utilizando Short Assessment of Health Literacy for Spanish-speaking Adults y el valor de colesterol, medicamentos, factores de riesgo y comorbilidades. Todas estas variables se analizaron en forma integrada en un análisis multivariado.

Resultados: Participaron 178 pacientes, 63% mujeres. El puntaje promedio de SAHLSA fue $43,4 \pm 5,5$. Se encontró una inadecuada alfabetización en 24% de los pacientes. El valor promedio de colesterol en este grupo de pacientes fue $235,17\text{mg/dl}$ vs $193,53\text{mg/dl}$ quienes tenían adecuada alfabetización en salud.

Se realizó un análisis multivariado que mostró asociación entre inadecuada alfabetización en salud, bajo nivel de educación y conocimiento del paciente. El número de internaciones y la aparición de eventos coronarios fueron significativamente mayor en los pacientes con alfabetización en salud insuficiente.

Conclusiones: Se encontró relación directa entre el grado de alfabetización en salud y los valores de colesterol total en pacientes en tratamiento por hipercolesterolemia.

Palabras clave: alfabetización en salud; hipolipemiantes; hipercolesterolemia.

Abstract

Introduction: Health literacy is a measure of the ability of patients to read, understand and make decisions based on medical instructions. Inadequate health literacy is associated with poorer health in patients with chronic diseases. Time of dispensing could be an opportunity for the primary care pharmacist to evaluate this condition by the.

The purpose of this study was to evaluate the relationship of Health literacy and the values of total cholesterol and comorbidities in people with a prescription of lipid-lowering drugs treated in a retirement center.

Method: A prospective study was designed where the relationship of Health literacy was evaluated using Short Assessment of Health Literacy for Spanish-speaking Adults and the value of cholesterol, medications, risk factors and comorbidities. All these variables were analyzed in an integrated manner in a multivariate analysis.

Results: 178 patients participated, 63% women. The mean SAHLSA score was 43.4 ± 5.5 . Inadequate HL was found in 24% of patients.

The mean cholesterol value in patients with inadequate Health literacy was 235.17mg/dl vs 193.53mg/dl among those with adequate Health literacy.

A multivariate analysis was performed that showed an association between inadequate Health literacy, the level of education and the patient's knowledge of normal values of total cholesterol. The number of hospitalizations and the occurrence of coronary events were significantly higher in patients with insufficient Health literacy.

Conclusions: A direct relationship was found between the degree of Health literacy and total cholesterol values in patients undergoing treatment for hypercholesterolemia.

Keywords: Health Literacy; lipid-lowering; hypercholesterolemia

Puntos clave

La AS es un desafío para los farmacéuticos, el momento de la dispensación es una oportunidad para comunicarnos con el paciente, compartir sus inquietudes explicando los alcances de su dolencia y mejorar la adherencia para alcanzar los objetivos terapéuticos propuestos.

Introducción

La alfabetización en la salud (AS) se define como la habilidad de las personas para obtener, procesar y entender información relacionada con la salud. Permite a los pacientes ser responsables en el cuidado de su salud siguiendo los lineamientos médicos. Los pacientes con AS inadecuada presentan un estado de salud lábil. La falta de conocimientos básicos relacionados con la salud, de familiaridad con la terminología y su comprensión, puede derivar en un incorrecto o ausente uso de medicamentos, ineficiente acceso a servicios médicos y el aumento del costo del cuidado de la salud debido a las dificultades que surgen por ejemplo para comprender la importancia de la prevención y el tratamiento de las enfermedades crónicas.⁽¹⁾ Se considera que la solución para la inadecuada AS es un desafío a fin de mejorar la salud pública y el cuidado médico de los pacientes.⁽²⁾

Actualmente, en Argentina no existen investigaciones para estimar un porcentaje de alfabetización adecuada o inadecuada de la salud. En otros países, como Estados Unidos, se estima que un 36% de la población presenta una inadecuada AS, demostrando una mayor limitación en aquellos que concurrían a hospitales públicos.⁽³⁾

Una de las formas de evaluar AS es el cuestionario Short Assessment of Health Literacy for Spanish-speaking Adults (SAHLSA), este instrumento está basado en el método Rapid Estimate of Adult Literacy (REALM) y ha sido adaptado al habla hispana, agregando un componente de comprensión del lenguaje⁽⁴⁾ SAHLSA evalúa la capacidad de lectura y comprensión de los participantes a través de 50 términos relacionados con la salud que el paciente debe leer y luego asociar correctamente con otro término. Cada lectura y asociación correctas serán evaluadas con 1 punto. El participante se considera con una AS adecuada si obtiene 38 puntos o más.⁽⁵⁾

La hipercolesterolemia es una patología crónica no transmisible que se caracteriza por la presencia de elevados niveles de colesterol en sangre, asociada a riesgos de padecer eventos cardiovasculares. Los niveles de colesterol en sangre considerados aceptables son de hasta 200 mg/dL.⁽⁶⁾ En Argentina, la prevalencia de colesterol elevado ha aumentado, aunque no de manera significativa, siendo del 27,8% en 2005 y del 29,8% en 2013 valor que se mantuvo en la última encuesta nacional de factores de riesgo, realizada en 2019 por el Ministerio de Salud de la Nación^(7,8)

La AS adecuada y el conocimiento sobre la hipercolesterolemia son indispensables para el manejo apropiado de la patología y su tratamiento. No hemos encontrado información sobre la hipercolesterolemia y la AS en Argentina. En otros países se considera una oportunidad el momento de la dispensación de tratamientos para poder conocer el nivel de AS y planificar estrategias que permitan empoderar a los pacientes conociendo sus enfermedades. El objetivo del trabajo es describir el perfil de alfabetización en salud de pacientes con tratamiento farmacológico con hipolipemiantes, analizar la asociación entre niveles de colesterol y comorbilidades (internaciones, eventos cardiovasculares, aspectos socio demográficos y escolarización) y la relación de estas variables con AS

Métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, de corte transversal en el Centro de Jubilados de la ciudad de Córdoba, Argentina. Se invitó a participar a aquellos pacientes mayores de 45 años, diagnosticados de hipercolesterolemia, los que aceptaron participar del estudio firmaron su consentimiento de conformidad. Se excluyeron pacientes que no hablaban español, no cumplían con la edad mínima y aquellos sin diagnóstico de la patología a estudiar.

Se determinó el tamaño de la muestra para una población finita mediante fórmula obteniendo como resultado un $n=176$ pacientes en representación de la población total. Para la evaluación de la AS se utilizó el Short Assessment of Health Literacy for Spanish-speaking Adults (SAHLSA). Para llevar a cabo el test, se les entregó a los pacientes 50 tarjetas plastificadas con el término a leer en negrita y debajo dos palabras, la clave y la distractora. Luego de leer la palabra, el participante debía asociarla a la clave o la distractora, y también tenía opción de contestar “no sé”, por eso se le pidió a cada paciente que no intentara adivinar la asociación correcta. El encuestador realizó los registros, cada lectura y asociación correctas se consideró con 1 punto. Si el participante obtuvo 38 puntos o más se consideró con una AS adecuada.⁽⁵⁾

Durante la entrevista se completó un cuestionario con datos sociodemográficos del paciente: sexo biológico, edad, nivel de estudios alcanzado, antecedentes familiares de hipercolesterolemia, si era o no fumador y si realizaba actividad física. Se consultó además sobre la medicación utilizada específicamente hipolipemiantes y otras patologías, aparición de eventos cardiovasculares internaciones en los últimos 5 años. Al concertar fecha para la entrevista y test se solicitó a los pacientes traer sus análisis correspondientes a colesterol total de los últimos 6 meses.

Al finalizar la entrevista, se entregó a cada uno de los pacientes un folleto informativo sobre la patología y el posible tratamiento no farmacológico, que puede consultarse de manera pública en el sitio web oficial de un laboratorio que comercializa especialidades en Argentina

Las variables cuantitativas se trabajaron con frecuencias absolutas (número de casos) y con frecuencias relativas (porcentajes). El análisis de asociación entre las variables se realizó con pruebas de Chi cuadrado y cuando fue posible, se calcularon los Odd ratios y sus intervalos de confianza correspondientes.

Para las variables cualitativas, se utilizaron el promedio y el desvío estándar como medidas descriptivas. En este caso, se realizaron tests de normalidad para evaluar la naturaleza de las mismas: tests de normalidad de Shapiro Wilks y test de Kolmogorow Smirnov. Se utilizó test T o test de Wilcoxon según correspondiera, para probar las hipótesis estadísticas planteadas. Se realizaron análisis multivariados: un análisis de correspondencias (ACP) para explorar la posible relación entre las variables; y una regresión logística para confirmar lo observado. En este último análisis, se utilizó como variable dependiente el resultado categorizado del score de SAHLSA (adecuado/inadecuado), y como regresoras, todas las variables categóricas que habían dado significativas en el análisis univariado.

Los resultados hallados en el ACP se corroboraron analizando cada una de las variables y que los pacientes tuvieran conocimientos adecuados o no.

Para todos los tests estadísticos, p -valores $<0,05$ se consideraron significativos. Se utilizaron los programas Infostat profesional versión 2019 y Stata versión demo para todos los cálculos estadísticos que fueron necesarios.⁽⁹⁾

Resultados

Se incluyeron 178 pacientes, con una edad promedio de 70 años (rango de 56 a 86). De ellos, el 63% fueron mujeres y el 35% del total estuvo hospitalizado en los últimos 5 años. El promedio general de valores de colesterol fue de $193,5 \pm 38,9$ mg/dL. El 50% de los pacientes tenía prescripción de rosuvastatina y el 39% de atorvastatina. En la Tabla 1 se pueden observar los resultados de las variables demográficas del total de las personas encuestadas.

Los pacientes tuvieron un promedio de $43,4 \pm 5,5$ en el score de SAHLSA; y solo el 24% tuvieron puntajes inadecuados.

Todas las variables estudiadas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes con adecuado o inadecuado AS, excepto el hecho de si fumaban o no (p -valor: 0,8969). Los pacientes con conocimiento adecuado fueron en su mayoría mujeres (68%), mientras que los que tuvieron conocimientos inadecuados fueron mayoritariamente hombres (52%) (p : 0,0146). Los resultados se detallan en la Tabla 2.

En los pacientes con conocimientos adecuados, la mayoría tenían estudios universitarios o terciarios (62%), mientras que en los con conocimientos inadecuados la mayoría tenían estudios secundarios (66%). En ambos grupos, los niveles descriptos incluían tanto a aquellos que habían finalizado dicho nivel como aquellos que lo habían dejado incompleto (p-valor <0,0001).

El 64% de las personas encuestadas que tuvieron conocimientos adecuados realizaban entre 2 a 5 horas de ejercicio; mientras que la mayoría de los que tuvieron conocimientos inadecuados no realizaban ninguna actividad física (45%) (p-valor <0,0001). El 10% de las personas con AS inadecuados conocían los valores normales de colesterol total, mientras que para aquellos con una AS adecuada fue el 70%.

Del análisis de correspondencias (ACP) se observó que los pacientes que tuvieron un nivel inadecuado de SAHLSA estuvieron más relacionados a tener niveles educativos incompletos (primario y secundario), a no realizar ejercicio y a haber sufrido algún accidente cardiovascular. Por el contrario, los pacientes con puntajes de SAHLSA adecuados, se relacionaron con niveles educativos elevados (secundario completo y universitario/terciario) y ausencia de antecedentes familiares, realizaban actividad física (en especial entre 2 y 5 horas). No refirieron haber sido internados en los últimos 5 años ni haber padecido accidente cardiovascular Figura 1.

Del análisis de asociación entre los valores de colesterol total de los encuestados y los puntos SAHLSA que obtuvieron al contestar las preguntas, se observó que existía una correlación negativa. Es decir, personas con puntajes bajos de SAHLSA tuvieron valores de colesterol más elevados, y a medida que aumentaban los puntos que obtenían en las respuestas del score, se observó una disminución en los valores de colesterol (p-valor < 0,0001, rho de Spearman: -0,56). Figura 2.

Se analizó si el nivel de educativo se asoció a episodios de internación en los últimos 5 años Figura 3, encontrándose un porcentaje mayor entre aquellas personas que tuvieron niveles educativos más bajos; dato que se revirtió en los grupos de mayor nivel educativo. Entre los pacientes que tuvieron primario completo (14 personas), el 50% estuvo internado en los últimos 5 años; de las personas con secundario incompleto, un 62,5%; y en aquellas con secundario completo o superior, las internaciones no superaron el 40%. (p-valor: 0,0071).

Se analizó si el puntaje del test SAHLSA estaba relacionado con la aparición de eventos cardiovasculares. El score de SAHLSA >38 se relacionó con la aparición de 10% de accidentes cardiovasculares, mientras que scores inferiores con el 36% (p-valor <0,001). Los pacientes con conocimientos inadecuados presentaron 5,3 veces más probabilidades de tener este tipo eventos que aquellos con conocimientos adecuados (IC95%: 2,27 - 12,16).

Cuando se realizó el análisis multivariado para establecer la asociación entre las variables que dieron significativas en la Tabla 2 y los conocimientos de SAHLSA, se encontró que las variables estadísticamente significativas fueron el nivel de educativo alcanzado (OR 4,8 IC2,5-92) y si conocían los valores normales de colesterol total. (OR11,4 IC 2,6-49,8) El resto de las variables no mostraron valores estadísticamente significativos.

Tabla 1. Características demográficas de la población encuestada

Variable	n	%
Sexo (F)	113	63%
Fuma (si)	48	27%
Puntaje SAHLSA adecuado	136	76%
Nivel educativo		
Primario completo	14	8%
Primario incompleto	1	1%
Secundario completo	52	29%
Secundario incompleto	24	13%
Terc/Univ completo	45	25%
Terc/Univ incompleto	42	24%
Antecedentes familiares		
Si	59	33%
No	45	25%
No sabe	74	42%
Ejercicio físico que realiza		
<2 horas	39	22%
2 - 5 horas	99	56%
>5 horas	7	4%
No realiza actividad física	33	19%
Conoce los valores normales de colesterol total (si)	99	56%
Sufrió algún accidente cardiovascular (si)	28	16%
Estuvieron internados en los últimos 5 años (si)	63	35%
Número de medicamentos que utiliza		
<2 medicamentos	10	6%
2-5 medicamentos	128	72%
>5 medicamentos	40	22%
Tratamiento hipolipemiente prescrito		
Atorvastatina + Ezetimibe	5	3%
Atorvastatina	69	39%
Ezetimibe	3	2%
Rosuvastatina	90	50%
Simvastatina + Ezetimibe	8	4%
Simvastatina	3	2%

Tabla 2. Resultados socio-demográficos, según el puntaje obtenido de SAHLSA.

Variable	Adecuado		Inadecuado		p-valor
	n= 136	%	n= 42	%	
Sexo (F)	93	68%	20	48%	0,0146
Fuma (Si)	37	27%	1	26%	0,8969
Nivel Educativo					<0,0001
Primario completo	3	2%	11	26%	
Primario incompleto	0	0%	1	2%	
Secundario completo	43	32%	9	21%	
Secundario incompleto	5	4%	19	45%	
Terc/Univ completo	44	32%	1	2%	
Terc/Univ incompleto	41	30%	1	2%	
Antecedentes familiares					<0,0001
Si	51	38%	8	19%	
No	41	30%	4	10%	
No sabe	44	32%	30	71%	
Ejercicio físico que realiza					<0,0001
<2 horas	28	21%	11	26%	
2-5 horas	87	64%	12	29%	
>5 horas	7	5%	0	0%	
No realiza actividad física	14	1%	19	45%	
Conoce los valores normales de colesterol total	95	70%	4	10%	<0,0001
Sufrió algún accidente cardio vascular	13	10%	15	36%	<0,0001
Estuvieron internados en los últimos 5 años	41	30%	22	52%	0,0084
Número de medicamentos que consume					<0,0001
<2 medicamentos	10	7%	0	0%	
2-5 medicamentos	107	79%	21	50%	
>5 medicamento	19	14%	21	50%	
Tratamiento hipolipemiente prescripto					<0,0001
Atorv+Ezet	4	3%	1	2%	
Atorvastatina	40	29%	29	69%	
Ezetimibe	3	2%	0	0%	
Rosuvastatina	82	60%	8	19%	
Simv+Ezet	6	4%	2	5%	
Simvastatina	1	1%	2	5%	

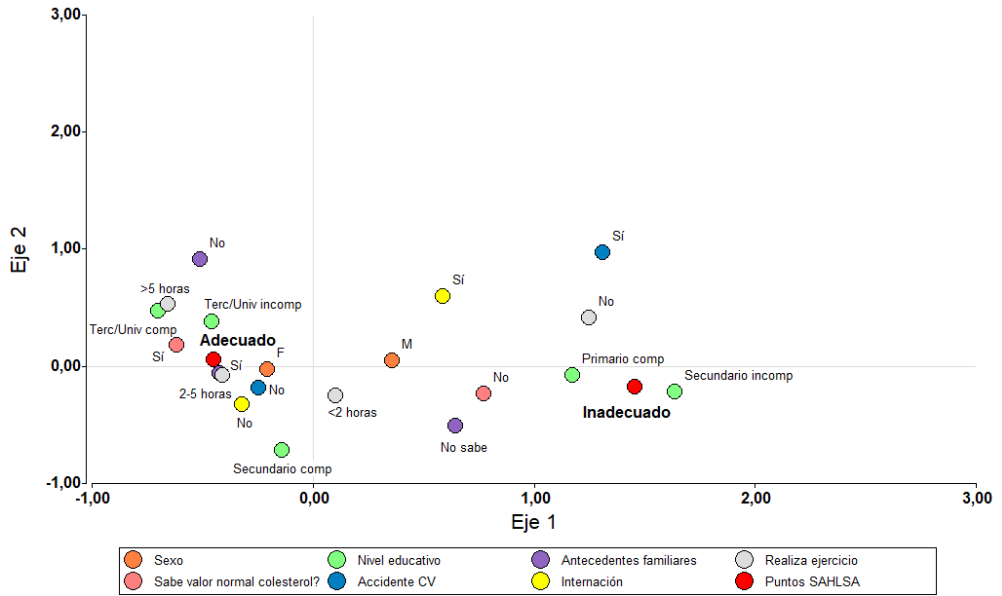


Figura 1. Análisis de correspondencias para todas las variables analizadas.

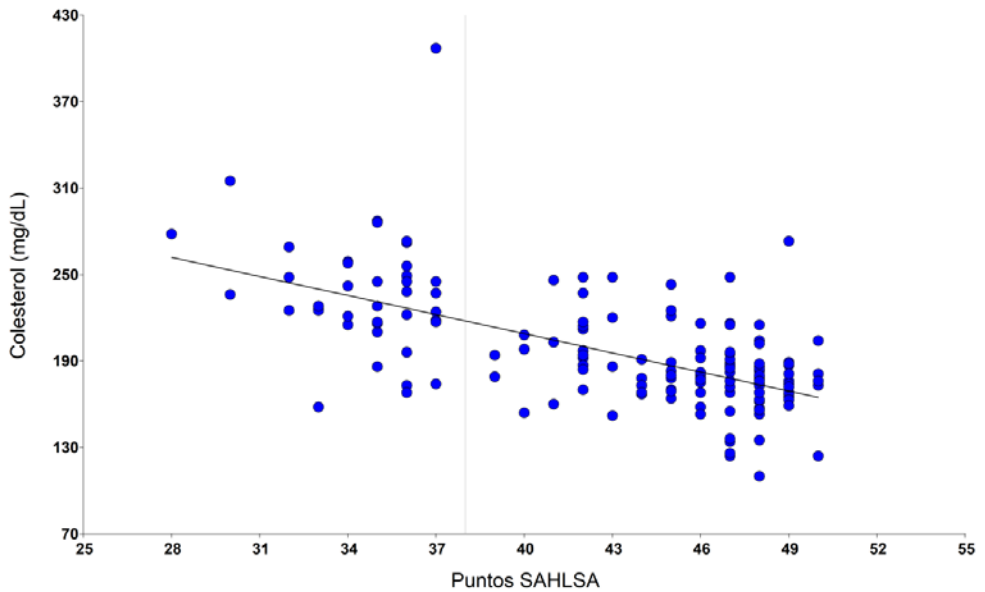


Figura 2. Correlación entre los valores de colesterol que presentaban los pacientes y los puntos de SAHLSA que obtuvieron en el test. La línea de corte en el eje X corresponde al límite entre el puntaje adecuado (>38) o inadecuado (<38).

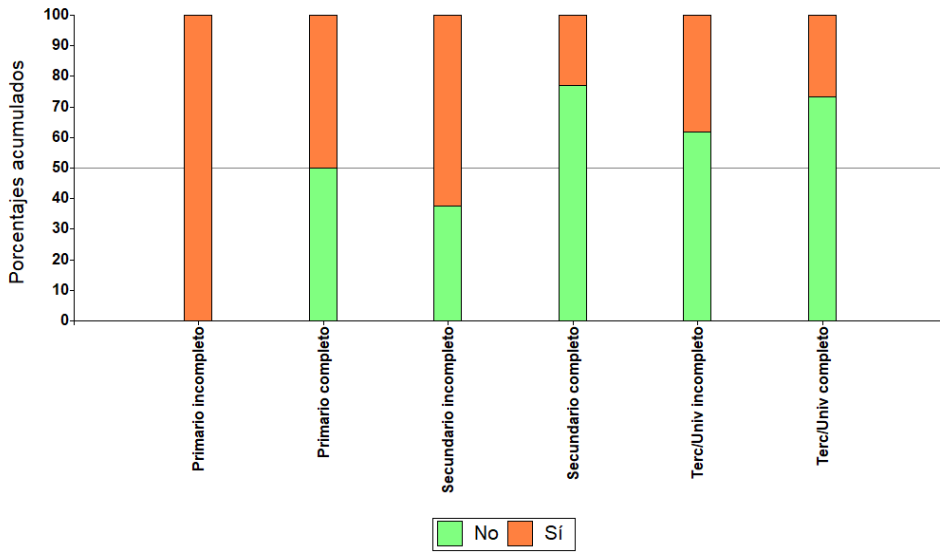


Figura 3. Porcentaje de internación en los pacientes, de acuerdo al nivel educativo que poseían. La línea de corte del eje Y marca el 50%

Discusión

La inadecuada Alfabetización en Salud está asociada al manejo incorrecto de patologías crónicas como la hipercolesterolemia. Nuestro principal objetivo era comprobar si la adecuada o inadecuada AS repercutió en los valores de colesterol total y hemos comprobado que aquellos pacientes que obtuvieron bajo puntaje en el test SAHLSA tenían niveles de colesterol total por encima del límite. A medida que el puntaje aumentaba, el nivel de colesterol total de los pacientes disminuyó (p -valor $<0,0001$). Por lo que se establece una correlación inversa entre ambas variables, que ha sido previamente demostrada por Ariza Bolívar en su estudio de AS y control de diabetes, y por Gazmararian, quien relaciona la AS con patologías crónicas.^(2,10)

Uno de los resultados más significativos del estudio, fue que el 62% de los pacientes que obtuvieron un score >38 puntos en el test SAHLSA habían alcanzado un nivel superior de estudios, ya sea completo o incompleto. En cambio, los pacientes con puntaje <38 , en su mayoría poseían nivel secundario o inferior (p -valor $<0,0001$). Esto establece una relación de proporcionalidad directa que existe entre el nivel de escolaridad de los pacientes y su conocimiento sobre la salud y su patología específica, la cual ha sido demostrada en estudios que utilizaron el test SAHLSA como herramienta para determinar el grado de AS de pacientes de habla hispana.⁽¹¹⁾

El análisis de correspondencias (ACP) explica un 48% de la variabilidad total hallada en los datos, por lo que puede ser que haya algún otro factor que esté generando variabilidad y no se ha tenido en cuenta en este trabajo.

Goldman, en su estudio sobre la percepción de los pacientes sobre el colesterol y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, describe que los pacientes con insuficiente AS en general no conocen los valores deseables de colesterol total. En nuestra investigación, a pesar de que todos los pacientes tenían conocimiento de que un valor elevado de colesterol total era perjudicial para su salud, solo el 10% de aquellos pacientes con insuficiente AS conocía los límites aceptables de colesterol total. Esto resultó

ser coincidente con lo publicado por Goldman, aunque en nuestro estudio no hubo pacientes que se refirieron al colesterol en términos absolutos.⁽¹²⁾

Un 52% de los pacientes con inadecuada AS manifestó haber sufrido internaciones, al menos una vez, en los 5 años previos al estudio, en contraposición a un 30% de los pacientes con adecuada AS. Estos resultados plantean una relación inversamente proporcional entre ambas variables, es decir, a medida que aumenta el grado de AS, disminuye la posibilidad de sufrir una hospitalización por parte de los pacientes. Un estudio previo, realizado por Baker en un hospital de Atlanta, Estados Unidos, comprobó la asociación entre estas variables obteniendo resultados similares a los que reveló nuestro estudio.⁽¹³⁾ Un artículo posterior también realizado por Baker en hospitales de cuatro ciudades de Estados Unidos, reveló que la inadecuada AS no es un factor de riesgo relevante para las internaciones hospitalarias.⁽¹⁴⁾ Debido a que la población de nuestro estudio es de tamaño reducido y sesgada, sería necesario realizar una investigación más extensa y exhaustiva para determinar si esta relación que es estadísticamente significativa se mantiene aumentando el número de participantes.

Por otra parte, un 36% de los pacientes con insuficiente AS declaró haber sufrido accidentes cardiovasculares, frente a un 10% de los pacientes con AS adecuada. Estos resultados son concordantes con los del estudio realizado por Fabbri en 2018, que identificó que la posibilidad de sufrir eventos cardiovasculares aumenta a medida que el grado de AS de los pacientes disminuye.⁽¹⁵⁾

El interés en AS el creciente y alentador hecho que los pacientes que asisten a sus consultas, realicen pruebas de laboratorio y ante resultados poco alentadores concurren a sus médicos tal como los muestran Parker Jacobson , esto favorece la detección y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y sus comorbilidades.⁽¹⁶⁾ Sin embargo, no todos los pacientes tienen la capacidad de interpretar sus resultados de laboratorio más aún cuando la población no tiene un adecuado nivel de educación. Esta limitante podría subsanarse utilizando herramientas informativas que en aquellas poblaciones de riesgo permite ayude a concientizar sobre cuidados generales.

Hay propuestas interesantes para lograr la adherencia a los tratamientos como la de Gosely y colaboradores quienes utilizando un audio-libro llegan a pacientes con baja AS, este tipo de instrumentos permiten amplia difusión ya que la mayoría de las personas actualmente cuenta con un dispositivo móvil donde pueden disponer de la información. Este estudio mostró que este tipo de intervenciones podría beneficiar a las personas que usen estatinas por ejemplo.⁽¹⁷⁾

Coincidimos con Hersh y col en que la información que se proporciona para alfabetizar a los pacientes debe ser comprensible a personas con diferentes niveles educativos, por lo que es necesario que cuando desarrollemos estos contenidos (folletos, indicaciones verbales o escritas) se considere un lenguaje claro y simple.⁽¹⁸⁾

Existe una amplia variedad de test utilizados para conocer la AS, nosotros utilizamos SAHLSA aunque algunas otras propuestas pueden ser más ágiles que la elegida, incluso algunas evalúan otras habilidades en los pacientes.⁽¹⁹⁾

Es necesario considerar algunas limitaciones del estudio. En primer lugar, al tratarse de un estudio de corte transversal, no sería posible establecer una relación causal entre la Alfabetización en Salud y los niveles elevados de colesterol. Sería conveniente realizar estudios longitudinales para confirmar los resultados. Por otra parte el centro de salud en el que este estudio fue realizado, incluye en su oferta de servicios sanitarios participación de las personas atendidas actividades como ejercicio físico y la atención de un especialista en nutrición. Sería útil investigar si en grupos con comportamientos más heterogéneos estos resultados se mantienen.

No se encontró datos sobre el tema estudiado en la revisión realizada en Argentina, solo un publicación que estudia AS en pacientes diabéticos.⁽²⁰⁾

La AS es un desafío para los farmacéuticos la dispensación puede ser el momento donde nos acercamos al paciente y nos comunicamos , mejoramos la adherencia está en nosotros utilizar herramientas simples par alcanzar los objetivos terapéuticos.⁽²¹⁾

Conclusión

En este estudio se encontró que el 76% de los pacientes tuvieron una adecuada alfabetización. Se observó correlación inversamente proporcional entre el grado de Alfabetización en Salud y los valores de colesterol total.

Encontramos una relación significativa de la AS con variables sociodemográficas y asociadas a la patología siendo la más relevante el nivel de escolaridad por la relación de proporcionalidad directa con su grado de AS.

La influencia de la AS en la aparición de eventos cardiovasculares y el número de internaciones fue de una proporcionalidad inversa, donde una adecuada AS disminuyó las posibilidades de sufrir internaciones y/o enfermedades cardiovasculares.

Bibliografía

1. Bostock S, Steptoe A. Association between low functional health literacy and mortality in older adults: longitudinal cohort study. *BMJ*. 2012 Mar 15;344:e1602. doi: 10.1136/bmj.e1602
2. Ariza Bolivar A, Lanteri M.E, Cícero CY, Pérez A, Puchulu FM, Mejía R. Alfabetización en salud y control de la diabetes en pacientes de un hospital universitario de Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2017; 77: 167-172.
3. Paasche-Orlow MK, Parker RM, Gazmararian JA, Nielsen-Bohlman LT, Rudd RR. The prevalence of limited health literacy. *J Gen Intern Med*. 2005; 20(2):175-84. doi: 10.1111/j.1525-1497.2005.40245.x.
4. Lee SY, Bender DE, Ruiz RE, Cho YI. Development of an easy-to-use Spanish Health Literacy test. *Health Serv Res*. 2006 41(4 Pt 1):1392-412. doi: 10.1111/j.1475-6773.2006.00532.x.
5. Falcón M, Basagoiti I. El paciente y la Alfabetización en Salud. En: *Alfabetización en salud: De la información a la acción*. Basagoiti I. (Ed.). Itaca, Valencia, España. 2012, pp. 65-96.
6. American Heart Association. ¿Qué significan mis niveles de colesterol? American Heart Association, 2012. En: https://www.heart.org/idc/groups/heart-public/@wcm/@hcm/documents/downloadable/ucm_316249.pdf
7. Galante M, Konfino J, Ondarsuhu D, Goldberg L, O'Donnell V, Begue C, Gaudio M, King A, Sciarretta V, Laspiur S, Ferrante D. Principales resultados de la 3ra Encuesta Nacional de Factores de Riesgo de enfermedades no transmisibles en Argentina. *Revista Argentina de Salud Pública* 2015; 6: 22-29.
8. Ministerio de Salud de la Nación. 4ª Encuesta Nacional de Factores de Riesgo, Presentación de los principales resultados. Ministerio de Salud de la Nación, Argentina, 2019. En: http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000001444cnt-2019-04_4ta-encuesta-nacional-factores-riesgo.pdf
9. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2019. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
10. Gazmararian JA, Williams MV, Peel J, Baker DW. Health literacy and knowledge of chronic disease. *Patient Educ Couns*. 2003;51(3):267-75. doi: 10.1016/s0738-3991(02)00239-2.
11. Kuo DMD, Thaker S, Duncan M, Puente M, Parra S., Rider A., Horter K., Pillow M.T. Use of Short Assessment of Health Literacy for Spanish Adults (SAHLA-50) to Determine the Health Literacy Rate of the Spanish-speaking Population in an Urban Emergency Department. *J Fam Strengths*. 2017; 17: 1-10.
12. Goldman RE, Parker DR, Eaton CB, Borkan JM, Gramling R, Cover RT, Ahern DK. Patients' perceptions of cholesterol, cardiovascular disease risk, and risk communication strategies. *Ann Fam Med*. 2006;4(3):205-12. doi: 10.1370/afm.534.
13. Baker DW, Parker RM, Williams MV, Clark WS. Health Literacy and the Risk of Hospital Admission. *J Gen Intern Med*. 1998; 13: 791-798.

14. Baker DW, Gazmararian JA, Williams MV, Scott T, Parker RM, Green D, Ren J, Peel J. Functional Health Literacy and the Risk of Hospital Admission Among Medicare Managed Care Enrollees. *Am J Public Health* 2002; 92: 1278-1283
15. Fabbri M, Yost K, Finney Rutten LJ, Manemann SM, Boyd CM, Jensen D, Weston SA, Jiang R, Roger VL. Health Literacy and Outcomes in Patients With Heart Failure: A Prospective Community Study. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(1):9-15. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.09.018
16. Parker RM, Jacobson TA. The role of health literacy in narrowing the treatment gap for hypercholesterolemia. *Am J Manag Care.* 2000;6(12):1340-2. PMID: 11151811.
17. Gossey JT, Whitney SN, Crouch, MA, Jibaja-Weiss ML, Zhang H, Volk R J. Promoting knowledge of statins in patients with low health literacy using an audio booklet. Patient preference and adherence, 2011;5:397-403. doi: 10.2147/PPA.S19995
18. Hersh L, Salzman B, Snyderman D. Health Literacy in Primary Care Practice *Am Fam Physician.* 2015;92(2):118-24. PMID: 26176370.
19. Morris NS, MacLean CD, Chew LD, Littenberg B. The Single Item Literacy Screener: evaluation of a brief instrument to identify limited reading ability. *BMC Fam Pract.* 2006;7:21. doi: 10.1186/1471-2296-7-21.
20. Konfino J, Mejia R, Ajdalani MP, Pérez-Stable EJ. Alfabetización en salud en pacientes que asisten a un hospital universitario. *Medicina (Buenos Aires)* 2009; 9: 631-634.
21. Johnson J, Moser L, Garwood C. Health literacy: a primer for pharmacist. *Am J Health Syst Pharm* 2013;70(11):949-55. doi: 10.2146/ajhp120306.

doi: 10.30827/ars.v63i2.22369

Artículos originales

Fumarase deficiency: a difficult diagnosis and a challenging treatment approach

Déficit de fumarasa: un difícil diagnóstico y abordaje terapéutico

Celia Castaño-Amores¹  0000-0003-1711-2730

Pelayo Nieto-Gómez²  0000-0003-4154-7937

¹Hospital San Cecilio, Servicio de Farmacia Hospitalaria, Granada, España

²Hospital Santa Bárbara, Servicio de Farmacia Hospitalaria, Puertollano, España

Correspondencia

Celia Castaño-Amores
celia_camores@hotmail.com

Recibido: 03.10.2021

Aceptado: 13.02.2022

Publicado: 21.04.2022

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

The authors declare no conflict of interest.

Resumen

Introducción: El déficit de fumarasa es una enfermedad rara del metabolismo, autosómica, que cursa con hipotonía, hiperlactacidemia y convulsiones. El diagnóstico basado en pruebas de laboratorio debe realizarse con precaución ya que la mayoría de enfermedades relacionadas con el metabolismo presentan la misma sintomatología: hipotonía, convulsiones y acidemia láctica y pirúvica.

Método: Analizar retrospectivamente el manejo farmacológico y nutricional de un neonato con síntomas relacionados con errores del metabolismo congénitos.

Resultados: La paciente de 3 meses de vida presentaba una mutación heterocigota en el gen de la fumarasa y síntomas relacionados con la alteración de la función enzima. La paciente presentaba hiperlactacidemia, aciduria orgánica y alteraciones analíticas de los aminoácidos. El primer diagnóstico supuesto fue un déficit de piruvato deshidrogenasa, por lo que se inició tratamiento nutricional con dieta cetogénica. Tras el alta de la paciente, volvió a ingresar por urgencias sufriendo una parada cardíaca y descompensación metabólica. El test genético reveló la presencia de una mutación heterocigota en el gen de la fumarasa. La sintomatología clínica pudo haber empeorado debido al difícil diagnóstico.

Conclusiones: El tratamiento farmacológico y nutricional del déficit de fumarasa es esencial para la buena evolución del paciente, pero es necesario que se realicen más estudios para entender con profundidad el mecanismo de los errores congénitos del metabolismo. Los equipos multidisciplinares permiten manejar la enfermedad desde distintos puntos de vista clínicos para un diagnóstico correcto y poder decidir el tratamiento adecuado con precisión.

Palabras clave: déficit de fumarasa; acidemia láctica; dieta cetogénica; enfermedad metabólica; aciduria orgánica.

Abstract

Introduction: Fumarase deficiency is a rare autosomal metabolic disease that course with hypotonia, hyperlacticaemia and seizures. Diagnosis based in laboratory test might be done carefully, as most of metabolic diseases present similar symptomatology: hypotony, convulsions, lactic and pyruvic acidemia.

Method: The objective is to analyse the pharmacological and nutritional approach of a neonate who presented symptoms of metabolic congenital disorders.

Results: The patient is a three-month girl with heterozygote mutation in fumarase gene, who presented clinical manifestations of the altered enzyme function. She presented hyperlacticaemia, organic aciduria and alterations of amino acid levels. First diagnosis suspected was pyruvate dehydrogenase deficiency, so nutritional treatment with ketogenic diet was initiated. After medical discharge, she was hospitalized in emergency basis with cardiac arrest and metabolic decompensation. Genetic test revealed a heterozygote mutation in fumarase. Clinical symptomatology could have worsened because of the difficult diagnosis.

Conclusions: Nutritional and pharmacological treatment of fumarase deficiency is considered essential for the patient's evolution, but further researchers must be carried out to profoundly understand the mechanism underlying metabolic inborn errors. Multidisciplinary teams would manage the disease from the point of view of diverse clinical experts so the correct diagnosis and treatment would be decided with precision.

Keywords: fumarase deficiency; lactic acidosis; ketogenic diet; metabolic disease; organic aciduria.

Highlight

Fumarase deficiency is a rare autosomal metabolic disease with a difficult diagnose. Treatment based on drugs is well established but nutritional support remains unclear. Ketogenic diet has been used in children to treat seizures refractory to antiepileptic drugs, but it seems to be contraindicated in fumarase deficiency or other enzyme failure of the Krebs cycle. Multidisciplinary team approach is essential to make the right diagnosis and adjust the correct treatment.

This study adds clinical information about the disease as the literature about metabolic errors as fumarase deficiency is limited.

Introduction

Fumarate hydratase (FH) deficiency was first described in 1987 by Zinn et al, reporting the case of a male infant with mitochondrial encephalopathy and other symptoms as lethargy, seizures, hypotonia, lactic, pyruvic and fumaric acidemia⁽¹⁾. Since then, less than 100 cases have been reported⁽²⁾. FH is involved in tricarboxylic acid cycle and cytosolic isoenzyme is involved in urea cycle. Fumarase also functions as a tumor suppressor. Heterozygote mutation is related with renal cell cancer and multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis⁽³⁾. Clinical manifestations of fumarase deficiency complicate the diagnosis of the syndrome, as hypotony, convulsions, lactic and pyruvic acidemia are some of the symptoms underlying other metabolic disorders and respiratory chain alterations. Management and treatment involve pharmacological, nutritional and in most of the cases, respiratory and cardiovascular support. Nowadays, prognostic and clinical evolution of the syndrome is still unfavourable as genetic approach of the disease continues in experimental trials⁽²⁾. We discuss the case of a three-month girl with heterozygote mutation in fumarase gene, who presented clinical manifestations of the altered enzyme function.

Method

We performed a bibliographic revision in Pubmed about fumarase deficiency using the terms: fumarase deficiency OR fumarate hydratase deficiency. The objective is to analyse retrospectively the pharmacological and nutritional approach of a neonate who presented symptoms of metabolic congenital disorders. This clinical revision of the case made retrospectively has low ethical impact.

A patient new-born is hospitalized at Neonatology Unit presenting hypotony, sensory alterations with no response to stimulus, stare and mild tachypnea. No fever, no cyanosis, either abnormal movement were reported. Empiric antibiotic therapy was initiated. Parents were informed and authorized lumbar puncture.

Results

After two hours from admission, the patient presented tonic-clonic seizures with general hypotony after the episode. Gasometry showed metabolic acidosis was maintained through the day. The following test results were obtained: pH 7.14; pCO₂ 45 mmHg; pO₂ 25 mmHg; lactic acid 9 mmol/L; HCO₃ 12.6 mmol/L; glucose 109 mg/dL; creatinine 0.23 mg/dL; negative PCR for viruses and bacteria; computed tomography (CT) normal; ammonium 59 µmol/L. Cerebral bioelectric activity resulted abnormal with focal slowing over the frontotemporal region. Organic aciduria (hyperlacticaemia without hyperammonaemia) and metabolopathy with seizure crisis was suspected, so treatment with cofactors was evaluated: Arginine 750 mg/day; riboflavin 100mg/day; carnitine 45 mg/8h; thiamine 100 mg/day; coenzyme Q105 mg/8h. After two days of hospitalization, parenteral nutrition with proteins 1g/kg/day; carbohydrates 4.5 mg/kg/min; lipids 0.5 g/kg/day was initiated as well as vitamin-therapy and levetiracetam 11 mg/kg/day. The fifth day, protein content in parenteral nutrition was 2.2 g/kg/day and results of ammonium, b-hydrobutiric in blood were normal, just pyruvic was elevated, possibly for com-

compensation of hyperlacticaemia. Cerebral activity continued to be abnormal and phenobarbital 4 mg/kg/b.d was added to pharmacotherapy. Through the days, test results showed lactic, pyruvic and alanine elevated in blood levels. Cephalorradin liquid tests showed hypoglycemia and an elevated levels of proteins and lactic acid. After 26 days of hospitalization, a muscular biopsy is programmed in suspicious of mitochondrial respiratory chain alterations, results obtained were normal. On the other hand, pyruvate dehydrogenase deficit was the first diagnostic option because of the clinical symptoms and analytic data. Nutritional treatment was re-evaluated and ketogenic diet was implemented considering risks and benefits. The highest level of lactate occurred when diet was exclusively composed by carbohydrates. Magnetic resonance image (MRI) showed lactate in periventricular substance and axonal symmetric degeneration in corticospinal tracts, manifestations of hypoxic ischemic insult.

Once she seemed stabilised, medical discharge was indicated. The patient continued with ketogenic diet and coenzymes and cofactors supply. After a month, the girl was hospitalized on an emergency basis with cardiac arrest. After 24 hours, she continued without neurological response to stimulus, mobility, either spontaneous respiration, manifesting hypotonic coma. Test results showed: troponine I, 235.7 pg/mL; ammonium, 201.2 $\mu\text{mol/L}$; hyperlacticaemia and metabolic acidosis with latter normalization of ammonium. Nutritional treatment was initiated with a low protein supply, combined with ketogenic diet. Phenobarbital 20mg/kg dosage was necessary for seizure activity. Forty-eight hours since cardiac arrest, she presented poor condition, needing an adaptative support ventilation. Genetic test revealed mutational change in fumarase gene.

Even though fumarase deficiency is an autosomal recessive metabolic disorder, this mutation is considered pathogenic. A urine metabolic screen found increased lactic acid, 3-methylmalonate, ethylmalonic and normal levels of fumaric acid, succinyl and alpha-ketoglutaric. Finally, clinicians agreed establishing sedation as the patient showed hypotonic coma and complications derived from metabolic decompensation.

Discussion

Fumarase deficiency is a rare autosomal recessive inborn error of the metabolism with clinical features common to other energy metabolism alterations and mitochondrial disorders. Our patient failed to thrive since birth and presented poor weight gain, hypotony, cerebral atrophy, seizures and acidosis. Lactic acidosis is reported in major of metabolic disorders and study of mitochondrial metabolism is required for diagnosis. Pyruvate dehydrogenase complex disorders are the principal cause of lactic acidosis in paediatrics⁽⁴⁾. The patient showed clinical symptoms related to pyruvate dehydrogenase deficiency so ketogenic diet was initiated. Efficacy of ketogenic diet in metabolic disorders is controversial, as it seems to be slightly effective⁽²⁾.

Nutritional approach in fumarase deficiency has been quite described in literature⁽⁵⁾. An increase in glucose has demonstrated an increase in lactate, as occurred in our case, when the highest level of lactate was reported with a diet only based in carbohydrates⁽²⁾. Protein restriction diet seems to be ineffective as fumaric acid would still be high in urine collection⁽⁶⁾. After ketogenic diet, urine metabolic test showed increased metabolites of valine and leucine catabolism (3-methylmalonate, ethylmalonic), which are properly ketogenic amino acids. During catabolism of those amino acids, acetoacetate, acetyl-coA and propionyl-coA are produced and degraded by fatty acid metabolism⁽²⁾.

Contrary to Smith and Robinson's results, fatty acid β -oxidation may not have diminished⁽⁷⁾. Ketone bodies produced in the liver during fatty acid metabolism apparently have neuroprotective actions in mitochondrial diseases⁽⁸⁾. Thus, ketogenic diet has been used in children to treat seizures refractory to antiepileptic drugs⁽⁸⁾, but it seems to be contraindicated in fumarase deficiency or other enzyme failure of the Krebs cycle⁽²⁾. Laboratory tests revealed high levels of most amino acids. It has been demonstrated fumarase deficiency alter amino acid metabolism including isoleucine, proline, lysine, glycine, citrulline, alanine, tyrosine and aspartic acid. FH metabolize fumarate into malate which is transformed in oxaloacetate and it can be converted to aspartate⁽⁹⁾. Study of amino acid in blood test revealed low concentration of aspartate while pyruvic acid, lactate and alanine remained high.

Phenotype-genotype correlations in FH deficiency has not been reported. Fumaric aciduria is highly suggestive of FH deficiency but it might not be reliable^(10,11). In our case, normal levels of fumarate in urine were detected. Ottolenghi et al. described three patients with different residual enzyme activity and clinical presentations. The manifestations that they describe of one of those patients are similar to this case: mildly or normal levels of urinary fumarate with lactate levels elevated in blood and cerebral spinal fluid⁽¹¹⁾. A case report described by Saini and Singhi either referred abnormal fumaric levels in urine⁽¹²⁾.

Therapeutic strategies are limited, patients with metabolic disorders usually present multisystemic syndrome. Secondary complications are the main cause of death during infancy^(13,14). Controlled tracing by physicians and health care providers including nutritionist, pharmacist, clinical geneticist and laboratory analyst is required to manage FH deficiency^(15,16,17).

Conclusions

Clinical course of fumarase deficiency is still unfavourable and management remains supportive. Laboratory test results might be considered cautiously in the assumption of a diagnosis. Treatment with cofactors may help stabilize enzyme activity, but further studies in metabolomics and gene therapy are required for inborn errors of metabolism. Due to lack of enough evidence about supportive therapy in FH deficiency we encourage other clinicians to share their findings. Multidisciplinary team approach is essential to make the right diagnosis and adjust the correct treatment by clinician experts in order to improve patient healthcare.

References

1. Zinn AB, Kerr DS, Hoppel CL. Fumarase deficiency: A new cause of mitochondrial encephalomyopathy. *N Engl J Med*. 1986;315(8):469–475. doi: 10.1056/NEJM198608213150801.
2. Ewbank C, Kerrigan JF, Aleck K. Fumarate Hydratase Deficiency. Seattle: Seattle, WA: University of Washington; 2013. [<http://www.genereviews.org/>] [PMID: 20301679]
3. Yang M, Soga, T, Pollard P J, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol*. 2012; 2:85. Doi:10.3389/fonc.2012.00085
4. Stern, H. J. Lactic Acidosis in Paediatrics: Clinical and Laboratory Evaluation, *Ann Clin Biochem*. 1994;31(5):410–419. Doi:10.1177/000456329403100502.
5. Ryder B, Moore F, Mitchell A, Thompson S, Christodoulou J, Balasubramaniam S. Fumarase Deficiency: A Safe and Potentially Disease Modifying Effect of High Fat/Low Carbohydrate Diet. *JIMD Rep*. 2018;40:77–83. Doi:10.1007/8904_2017_65
6. Kimonis VE, Steller J, Sahai I, et al. Mild fumarase deficiency and trial of a low protein diet. *Mol Genet Metab*. 2012;107(1–2):241–242. Doi: 10.1016/j.ymgme.2012.04.010.
7. Smith AC, Robinson AJ. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Syst Biol*. 2011;5:102. Doi: 10.1186/1752-0509-5-102.
8. Schiff M, Bénit P, Jacobs HT, Vockley J, Rustin, P. Therapies in inborn errors of oxidative metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(12):488-495. Doi:10.1016/j.tem.2012.04.006
9. Hou E, Li X, Liu Z, Zhang F, Tian, Z. Combined metabolomic and correlation networks analyses reveal fumarase insufficiency altered amino acid metabolism. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(4), 1–9. Doi:10.1002/bmc.4133
10. Bayley JP, Launonen, V, Tomlinson, IP. The FH mutation database: An online database of fumarate hydratase mutations involved in the MCUL (HLRCC) tumor syndrome and congenital fumarase deficiency. *BMC Med Genet*.2008;9:20. Doi:10.1186/1471-2350-9-20

- 11.** Ottolenghi C, Hubert L, Allanore Y et al. Clinical and biochemical heterogeneity associated with fumarase deficiency. *Hum Mutat.* 2011;32(9):1046–1052. doi: 10.1002/humu.21534.
- 12.** Saini AG, Singhi P. Infantile metabolic encephalopathy due to fumarase deficiency. *J Child Neurol.* 2013;28(4), 535–537. Doi:10.1177/0883073812447286
- 13.** Loeffen J, Smeets R, Voit T, Hoffmann G, Smeitink J. Fumarase deficiency presenting with periventricular cysts. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(5):799–800. Doi: 10.1007/s10545-005-0044-7
- 14.** Peetsold M, Goorden S, Breuning M, et al. Fumarase deficiency: A case with a new pathogenic mutation and a review of the literature. *J Child Neurol.* 2021;36(4):310-323. doi:10.1177/0883073820962931
- 15.** Chaturvedi S, Singh AK, Keshari AK, Maity S, Sarkar S, Saha S. Human Metabolic Enzymes Deficiency: A Genetic Mutation Based Approach. *Scientifica (Cairo).* 2016; 2016:9828672. doi:10.1155/2016/9828672
- 16.** Cardellach F, Ribes A. Medicina interna y enfermedades raras. Transición niño-adulto. *Arbor.* 2018;194(789): a460. Doi:10.3989/ arbor.2018.789n3002
- 17.** Boyer SW, Barclay, LJ, Burrage LC. Inherited Metabolic Disorders. *Nutr Clin Pract.* 2015;30: 502-510. doi:10.1177/0884533615586201

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i2.22430

Artículos originales


Naringin: antitumor potential in silico and in vitro on bladder cancer cells

Naringina: potencial antitumoral in silico e in vitro en células cancerosas de vejiga

Débora Carvalho Radicchi^{1,2}  0000-0001-6213-3886

André Sacramento Melo²  0000-0001-8650-0089

Ana Paula Braga Lima^{2,3}  0000-0003-0271-0519

Tamires Cunha Almeida^{2,3}  0000-0002-5584-3609

Gustavo Henrique Bianco de Souza^{3,4}  0000-0002-1548-3274

Glenda Nicioli da Silva^{1,2,3*}  0000-0001-9751-3379

¹Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (CBIOL), Ouro Preto, Brazil.

²Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, Ouro Preto, Brazil.

³Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA), Ouro Preto, Brazil.

⁴Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), Ouro Preto, Brazil.

Correspondence

Glenda Nicioli da Silva
nicioli@ufop.edu.br

Recibido: 18.10.2021

Aceptado: 13.02.2022

Publicado: 21.04.2022

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number CNPq-310905/2020-6 (CNPq Research Productivity Scholarship), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance code 001) and Universidade Federal de Ouro Preto, grant number 23109.000928/2020-33.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Other Declarations

This manuscript has not been published or presented elsewhere in part or in entirety and is not under consideration by another journal.

Resumen

Introducción: el carcinoma urotelial es un problema de salud pública importante. El carcinoma de células de transición es el subtipo más común y representa aproximadamente el 90 % de todos los cánceres de vejiga. Se han estudiado protocolos quimioterapéuticos, pero algunos presentan alta toxicidad y baja tolerabilidad. La naringina es un compuesto polifenólico que se encuentra principalmente en los cítricos, cuya actividad antitumoral se ha estudiado en varios tipos de cáncer. Sin embargo, hay poca información sobre los efectos de la naringina en el cáncer de vejiga. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial antitumoral de la naringina *in silico* e *in vitro* utilizando dos líneas celulares de cáncer de vejiga.

Método: el análisis *in silico* se llevó a cabo mediante el software PASS Online. *In vitro*, se evaluaron los efectos del tratamiento con naringina (12,5 - 400 μ M) en cuanto a su citotoxicidad, supervivencia clonogénica, alteraciones morfológicas, progresión del ciclo celular, migración y mutagenicidad.

Resultados: los análisis *in silico* predijeron la actividad antitumoral a través de varios mecanismos de acción. Los resultados *in vitro* mostraron que la naringina presentó efectos citotóxicos, redujo el número de colonias, inhibió la migración celular y cambió la morfología y la progresión del ciclo celular de las dos líneas celulares evaluadas. Sin embargo, la naringina no presentó efectos mutagénicos.

Conclusiones: la naringina tiene actividad antiproliferativa y es un candidato prometedor para el tratamiento del cáncer de vejiga.

Palabras clave: cáncer de vejiga; flavonoide; *in silico*; naringina; progresión del ciclo celular

Abstract

Introduction: Urothelial carcinoma is a significant public health problem. Transitional cell carcinoma (TCC) is the most common subtype, accounting for approximately 90 % of all bladder cancers. Chemotherapeutic protocols have been studied, but some present high toxicity and low tolerability. Naringin is a polyphenolic compound found mainly in citrus fruits, which antitumor activity has been studied in several types of cancer. However, there is little information about naringin effects on bladder cancer. This study aimed to evaluate the antitumor potential of naringin *in silico* and *in vitro* using two bladder cancer cell lines

Method: *In silico* analysis was carried out by PASS Online software. *In vitro*, the effects of naringin treatment (12.5 - 400 μ M) were evaluated regarding its cytotoxicity, clonogenic survival, morphological alterations, cell cycle progression, migration, and mutagenicity

Results: *In silico* analyses predicted antitumor activity through several mechanisms of action. *In vitro* results showed naringin presented cytotoxic effects, reduced the number of colonies, inhibited cell migration, and changed the morphology and cell cycle progression of the two cell lines evaluated. However, naringin did not present mutagenic effects.

Conclusions: Naringin has antiproliferative activity and is a promising candidate for bladder cancer treatment.

Keywords: bladder cancer; cell cycle progression; flavonoid; *in silico*; naringin

Highlights

Several studies have demonstrated the therapeutic potential of naringin against diabetes, allergies, asthma, osteoporosis, hypertension and cancer, as well as protection of gastrointestinal tract. However, the antineoplastic effects of naringin in bladder cancer have been poorly studied. Our results showed naringin presented cytotoxic effects, reduced the number of colonies and inhibited cell migration, demonstrating naringin could be a promising candidate for bladder cancer treatment.

Introduction

Worldwide, 0.573 million new cases and almost 0.212 million deaths due to bladder cancer were estimated in 2020⁽¹⁾. Urothelial carcinoma and transitional cell carcinoma (TCC) are the most common type and subtype of bladder cancer, respectively. About 75 % of urothelial carcinoma patients have tumors confined to the bladder mucosa or submucosa, which are usually treated with transurethral resection of the tumor and intravesical therapy⁽²⁾. On the other hand, for that 25 % of patients with muscle-invasive disease, more aggressive therapy is necessary, including partial or total cystectomy and systemic chemotherapy with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin, protocol known as MVAC⁽³⁾.

The main difficulty found for cancer therapy is the toxicity accompanied by high failure rates, which justifies the search for potential natural products as a therapeutic alternative⁽⁴⁾. Because of its diverse chemical structure, bioactive natural products are capable of modulating the cancer microenvironment and diverse cell signaling pathways⁽⁵⁾.

Among natural compounds with pharmacological potential, naringin, a flavonoid found mainly in citrus fruits, has been gaining attention because of its anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor properties⁽⁶⁾. There is strong evidence for the association between treatment with naringin and antitumor activity, through modulation of several signaling cascades involved in cell proliferation, autophagy, apoptosis, angiogenesis, metastasis, and invasion⁽⁷⁾. Despite data showing that naringin can induce antiproliferative effects in many types of cancer cells, there is only one study demonstrating the effects of naringin on bladder cancer cells⁽⁸⁾.

In this context, this study aimed to investigate the antineoplastic potential of the naringin *in silico* and *in vitro* on bladder cancer cells by exploring its effect on cell proliferation, morphology, migration, cell cycle progression, and its ability to induce mutagenic effects.

Methods

Quantitative structure–activity relationship (QSAR) analysis

The naringin structure (Figure 1) was subjected to quantitative structure–activity relationship (QSAR) analysis using the platform Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS online) to predict its antitumor potential and possible mechanisms of action. The naringin is a disaccharide derivative that is (S)-naringenin substituted by a 2-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl moiety at position 7 via a glycosidic linkage (PubChem CID 442428). The results are provided as a probability that the compound is active (Pa) and inactive (Pi). Fourteen antitumor effects and mechanisms of action related to the tumorigenesis process were analysed. The results were expressed by difference Pa-Pi and were classified as Pa-Pi < 0.2: low potential, Pa-Pi \geq 0.5: moderate potential and Pa-Pi \geq 0.5: high potential⁽⁹⁾.

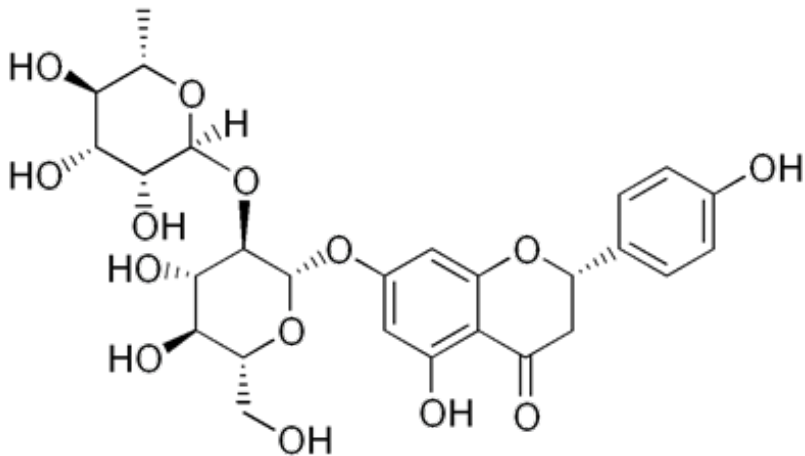


Figure 1. Naringin structure constructed using software ChemDraw.

Cell lines and naringin

The cell lines 5637 and T24 from urinary bladder tumors were kindly donated by Dr. Daisy Maria Fávero Salvadori from Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Brazil. The cell lines were maintained as described by Da Silva et al⁽¹⁰⁾. Naringin ($\geq 95\%$) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) and was solubilized at $400 \mu\text{M}$ in culture medium with 2 % dimethylsulfoxide (DMSO) immediately before its use. Previous study of our research group has demonstrated that 2% DMSO does not alter the viability of 5637 and T24 cells⁽¹¹⁾.

Cytotoxicity

Cytotoxicity was assessed using the Cell Proliferation Kit II (XTT), from Roche Diagnostics (Manheim, Germany). Briefly, 1.0×10^4 cells/well were seeded in 96-well culture plates. After incubating for 24 hours, cells were treated with different concentrations of naringin (12.5, 25, 50, 100, 150, 200 and $400 \mu\text{M}$) for 24 hours. Untreated cells were cultured in parallel as a negative control. The culture medium was removed and cells were washed with Hank's solution (0.4 g KCl, 0.06 g KH_2PO_4 , 0.04 g Na_2HPO_4 , 0.35 g NaHCO_3 , 1 g glucose and 8 g NaCl in 1000 mL H_2O). XTT test solution was diluted in culture medium without phenol red and was added to each well. After 1 hour of incubation, the absorbance was measured using a microplate reader at the wavelength of 490 nm⁽¹²⁾. The absorbance results are proportional to the percentage of viable cells. Experiments were performed in technical triplicate.

Morphological analysis

To evaluate the effects of the treatment with naringin on morphology, 5637 and T24 cells were seeded at the density of 2.0×10^5 cells/well in 12-well culture plates and incubated for 24 hours. Afterwards, cells were treated with naringin (150 and $200 \mu\text{M}$) for 24 hours. Cells were observed and photographed using an inverted phase-contrast microscope at 200 x magnification⁽¹³⁾. Experiments were performed in technical triplicate.

Clonogenic assay

For evaluating the long-term effects of naringin, the cells were plated at a density of $1.0 \times 10^6/25 \text{ cm}^3$ culture flasks. After 24 hours, cells were treated with naringin (100, 150, 200, and $400 \mu\text{M}$) and were incubated for 24 hours. Subsequently, cultures were rinsed with Hanks' solution and the cells were removed using trypsin. Cells were plated into 12-well culture plate at 1.0×10^3 cells/well and allowed to grow for 10 days to form colonies. Afterwards, the cells were fixed with 10 % formaldehyde and stained

with 0.5 % crystal violet. Absorbance was measured using a microplate reader at 560 nm wavelength⁽¹¹⁾. Experiments were performed in technical triplicate.

Cell cycle analysis

To analyse the cell cycle progression after the treatment with naringin, cells were seeded at the density of 2.0×10^5 cells/well in 12-well culture plates and incubated for 24 hours. Cells were treated with naringin (100, 150, 200, and 400 μ M) for 24 hours. After the treatment, cells were washed with Hank's solution, trypsinized and centrifuged at 1,000 rpm for 10 minutes. The cell pellet formed was fixed with 70 % ethanol and maintained at -20 °C for 12 h. Subsequently, cells were washed with Hank's solution, centrifuged and resuspended in 200 μ L of labelling solution (0.0914 g of magnesium chloride; 0.0774 g of sodium citrate; 0.04766 g of Hepes; 10 μ L of Triton-X, 500 μ L of propidium iodide, and 9490 μ L of water). Cells were placed on ice and incubated protected from light for 30 minutes. The percentages of cells in the different cell cycle phases were measured using flow cytometry (BD FACSCalibur) and analysed using FlowJo® software⁽¹⁴⁾. Data from 30,000 cells were collected in each file. Experiments were performed in technical triplicate.

Wound healing assay

To assess the influence of the treatment with naringin on cell migration, the wound healing assay was performed. Cells were seeded at the density of 4.0×10^5 cells/well in 12-well culture plates. After 24 hours, the confluent cell monolayer was scraped with 200 μ l sterile pipette tip to create a wound. The wound was photographed using an inverted phase-contrast microscope at 40x magnification. Afterwards, cells were treated with naringin (100, 150, 200, and 400 μ M) for 24 hours. Finally, cells were again observed and photographed⁽¹⁵⁾. Cell migration was quantified through Image J® software by measuring the wound width in three random selected microscopic fields.

Cytokinesis-block micronucleus assay and nuclear division index (NDI)

The micronucleus assay with cytokinesis blockage was performed to assess the mutagenic potential of the treatment with naringin. Cells were plated at the density of 1.0×10^6 cell/plate in Petri dishes and incubated for 24 hours. Cells were treated with naringin (100, 150, 200, and 400 μ M) for 4 hours and with doxorubicin (0.4 g/ml) for 2 hours as a positive control. After the treatments, cells were washed with Hank's solution, cultured with 15 μ L of cytochalasin B (2 mg/mL) and incubated for more 24 hours. Afterwards, cells were trypsinized, hydrated with KCl 0.075 M and fixed on microscope slides with methanol and acetic acid. The microscope slides were then stained with 5 % Giemsa. One thousand binucleated cells were analyzed in each slide to determine the frequencies of micronucleated cells. Five hundred cells were analyzed in each slide to determine the NDI. The NDI was calculated as previously described by Fenech⁽¹⁶⁾: $NDI = M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4) / N$, whereas M1-M4 is the number of cells with 1-4 nuclei and N is the total number of viable cells.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by GraphPad Prism® 6. The data were analysed by one-way ANOVA and *post hoc* analysis by Tukey's test. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Quantitative structure–activity relationship (QSAR) analysis

The QSAR analysis showed that naringin presents high potential to act as anticarcinogenic, antineoplastic, and antimetastatic. The mechanisms of action with high potential are related to apoptosis (caspase 3 stimulant, caspase 8 stimulant, and apoptosis agonist), cytostatic effects and Myc inhibition. In addition, inhibition of DNA synthesis and expression inhibition of *RELA* and *MMP9* genes were predicted as moderate potential (Table 1).

Table 1. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) analysis for potential antitumor activities of naringin using the PASS online tool

Activities	Pa - Pi value
Anticarcinogenic	0.984
Caspase 3 stimulant	0.892
Antineoplastic	0.852
Cytostatic	0.805
Caspase 8 stimulant	0.727
Apoptosis agonist	0.713
Myc inhibitor	0.586
Antimetastatic	0.507
DNA synthesis inhibitor	0.479
<i>RELA</i> expression inhibitor	0.303
<i>MMP9</i> expression inhibitor	0.229
DNA repair enzyme inhibitor	0.114
P-glycoprotein inhibitor	0.102
DNA intercalator	0.039

Pa: potential to be active; Pi: potential to be inactive; Pa-Pi < 0,2: Low potential; Pa-Pi ≥ 0.5: Moderate potential; Pa-Pi ≥ 0.5: High potential

Cytotoxicity and cell morphology

The cytotoxicity results are show in Figure 2-a. Significant reduction in cell viability was observed in 5637 cells after treatment with 100, 150, 200, and 400 µM. In T24 cells, significant reduction in cell viability was observed at 150, 200, and 400 µM of naringin.

The evaluation of cell morphological alterations caused by the treatment with naringin shows cellular debris and digitiform projections on both cell lines tested, as can be observed in Figure 2-b.

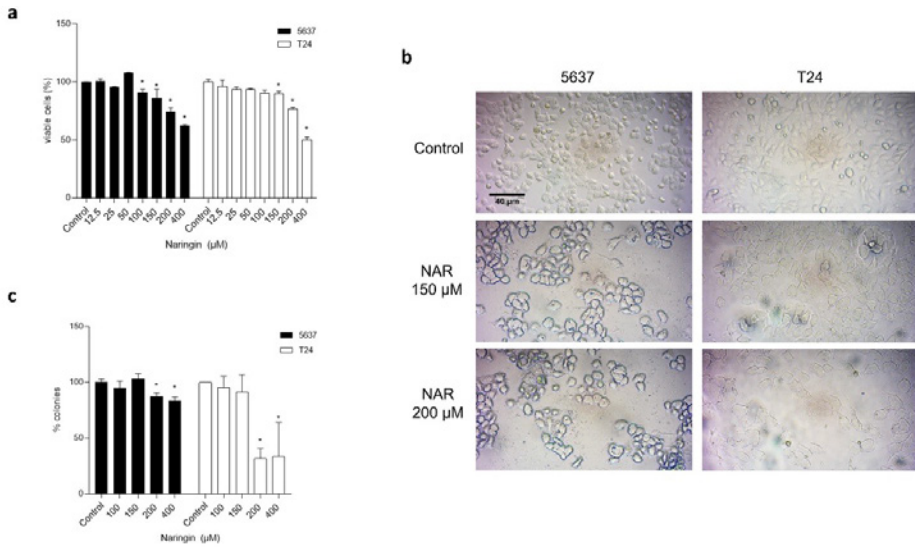


Figure 2. a) Percentages of viable 5637 and T24 cells after 24-h treatment with naringin. Control: untreated cells. * $p < 0.05$ compared with negative control. Each point represents the mean value obtained from three independent experiments. b) Photomicrographs of 5637 and T24 cells after 24-h treatment with naringin. Inverted phase-contrast optical microscope, 200x magnification. Control: untreated cells. NAR: naringin. c) Percentages of 5637 and T24 cell colonies after 24-h treatment with naringin. Control: untreated cells. * $p < 0.05$ compared with negative control. Each point represents the mean value obtained from three independent experiments.

Clonogenic survival

The results of clonogenic survival assay are presented on Figure 2-c. As can be observed, the long-term proliferation was changed after treatment with 200 µM and 400 µM for both cells.

Cell cycle progression

The results of the cell cycle analysis are shown in Figure 3. In 5637 cells, there was a significant increase in the number of cells in G0/G1 phase, followed by a significant reduction of cells in S and G2/M phases. In T24 cells, there was a significant increase in the number of cells in G2/M phase after treatment with the highest concentration of naringin.

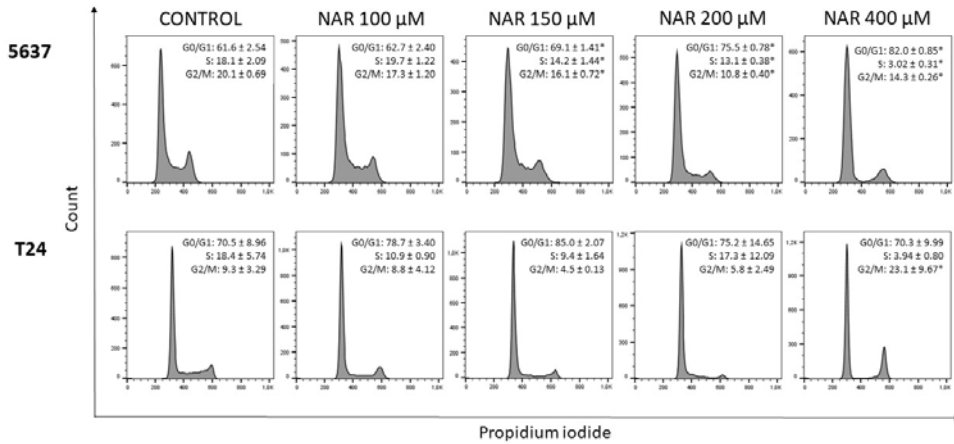


Figure 3. Quantification and representative histograms of cell cycle progression for 5637 and T24 cells after 24-h treatment with naringin. Control: untreated cells. * $p < 0.05$ compared with negative control. Each point represents the mean value obtained from three independent experiments.

Cell migration

The results of cell migration assay are presented in Figure 4. Naringin inhibited cell migration in both cell lines.

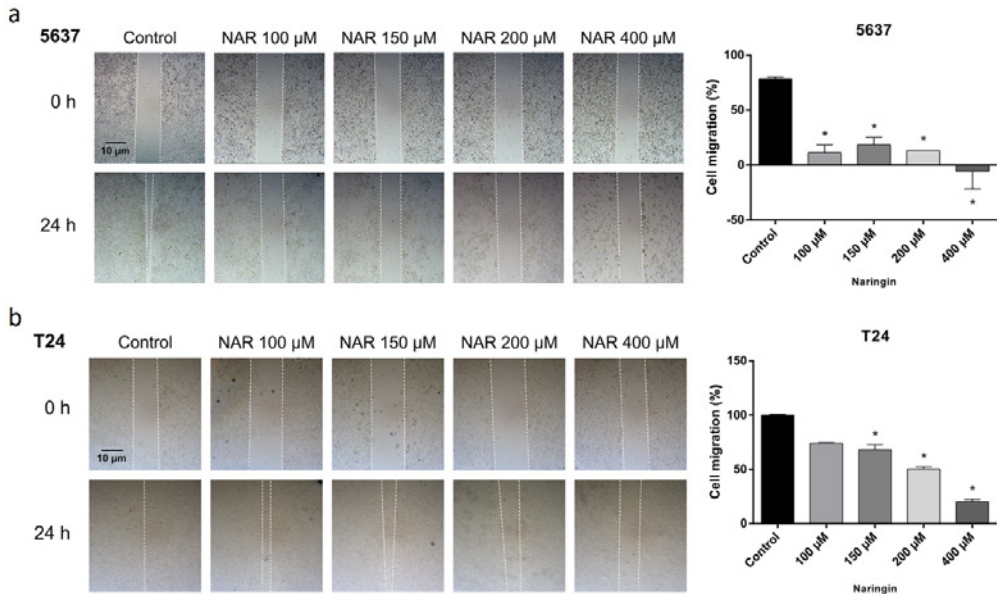


Figure 4. Photomicrographs and quantification of cellular migration of (A) 5637 and (B) T24 cells after 24-h treatment with naringin. Control: untreated cells. NAR: naringin. * $p < 0.05$ compared with negative control. Each point represents the mean value obtained from three independent experiments. Inverted phase-contrast optical microscope, 40x magnification.

Micronucleus assay and nuclear division index (NDI)

Naringin treatment did not cause an increase in the frequency of micronuclei (Table 2). In T24 cells, there was a significant decrease in NDI after treatment with naringin at the highest concentration (Table 3).

Table 2. Frequencies of micronucleated (%o) cells after treatment with naringin

	Control	Positive Control	Naringin 100 μ M	Naringin 150 μ M	Naringin 200 μ M	Naringin 400 μ M
5637	0.004 \pm 0.001	0.014 \pm 0.002*	0.003 \pm 0.002	0.004 \pm 0.002	0.004 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001
T24	0.008 \pm 0.001	0.015 \pm 0.002*	0.006 \pm 0.001	0.009 \pm 0.001	0.008 \pm 0.002	0.006 \pm 0.001

Control: untreated control. Positive control: doxorubicin (0.4 μ g/mL). $p < 0.05$ compared to control.

Table 3. Nuclear division index (NDI) for the 5637 and T24 cells after the treatment with naringin

	Control	Naringin 100 μ M	Naringin 150 μ M	Naringin 200 μ M	Naringin 400 μ M
5637	1.721 \pm 0.014	1.705 \pm 0.031	1.697 \pm 0.036	1.707 \pm 0.018	1.668 \pm 0.010
T24	1.830 \pm 0.022	1.854 \pm 0.024	1.809 \pm 0,037	1.793 \pm 0.014	1.751 \pm 0.028*

Control: untreated control. $p < 0.05$ compared to control.

Discussion

We conducted this study aiming to explore the antitumor effects of naringin and its mechanism of action on bladder cells. The use of *in silico* studies are interesting tools for the drug discovery process, especially to understand more about poorly studied compounds in a fast and low-cost process⁽¹⁷⁾.

According to *in silico* analysis, the cell death caused by naringin in bladder cancer cells observed in the cytotoxicity assay might occur through apoptosis. In addition to the high probability to act as an apoptosis agonist, naringin also presents a high probability to stimulate caspase-8 and caspase-3. Caspase-8 is characterized as an enzyme that initiates the extrinsic apoptotic cell death pathway induced by the activation of death receptors⁽¹⁸⁾. Caspase-3 acts as an effector caspase, cleaving several substrates that cause the morphological and biochemical changes seen in apoptotic cells⁽¹⁹⁾. Indeed, in hepatocellular carcinoma cells, naringin treatment caused an increase in caspase-3 and caspase-8 activities⁽²⁰⁾. In addition, the morphological changes observed in T24 and 5637 cells are also associated with the apoptosis process^(21,22).

The *in silico* predicted moderate potential to inhibiting DNA synthesis was confirmed by clonogenic survival assay that determines the ability of a cell proliferates indefinitely, retaining its reproductive capacity after being exposed to a substance⁽²³⁾. Clonogenic survival the most appropriate endpoint for measuring cell death in tumor cell lines⁽²⁴⁾.

The naringin effect on cell cycle arrest corroborated the prediction of a high probability of naringin acting as a cytostatic agent. Several other studies also demonstrated the ability of naringin to modulate cell cycle progression^(25,26,27). Naringin effects on cell cycle seem to be related to modulation of the

complexes of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cyclin-dependent kinases inhibitors⁽⁸⁾, in addition to inhibiting c-MYC expression^(28,29).

Also confirming the *in silico* prediction of antimetastatic effect, naringin inhibited cell migration in bladder cancer cells. Similar effects of naringin have been observed in other types of cancer^(30,31). Tan et al.⁽³²⁾ suggested that the anti-metastatic properties of naringin seem to be associated with the down-regulation of matrix metalloproteinases. Indeed, the *in silico* results suggested naringin ability to inhibit MMP9 expression, a matrix metalloproteinase with crucial role in cancer progression⁽³³⁾. Additionally, there is a moderate probability to naringin inhibit the RELA gene expression, which encodes the protein p65 that is upregulated in bladder cancer and is associated to cell migration⁽³⁴⁾.

Regarding to micronucleus assay, treatment with naringin was not capable of inducing mutagenicity to neither of the cell lines tested. In human lymphocytes, naringin also did not induce micronucleus formation⁽³⁵⁾, showing that this compound has not clastogenic or aneugenic potential.

In conclusion, our study corroborates the antiproliferative potential of naringin on bladder tumor cells and shows cytotoxicity, damage in the reproductive capacity, interference in the cell cycle progression, and alteration in cell migration by mechanisms unrelated to aneugenic or clastogenic activity. The *in silico* analysis showed that the mechanisms of action could be related to apoptosis (caspase 3 stimulant, caspase 8 stimulant, and apoptosis agonist) and Myc protein and RELA and MMP9 gene inhibition.

References

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;144(8):1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937
2. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3(17022):1-19. doi: 10.1038/nrdp.2017.22
3. Chang SS, Bochner BH, Chou R, Dreicer R, Kamat AM, Lerner SP, et al. Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline. *J Urol*. 2017;198(3):552-559. doi: 10.1016/j.juro.2017.04.086
4. Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *Br J Pharmacol*. 2020;177(6):1409-1423. doi: 10.1111/bph.14816
5. Dutta S, Mahalanobish S, Saha S, Ghosh S, Sil PC. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem Toxicol*. 2019;128:240-255. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.012
6. Chen R, Qi QL, Wang MT, Li QY. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharm Biol*. 2016;54(12):3203-3210. doi: 10.1080/13880209.2016.1216131
7. Ghanbari-Movahed M, Jackson G, Farzaei MH, Bishayee A. A systematic review of the preventive and therapeutic effects of naringin against human malignancies. *Front Pharmacol*. 2021;12:639840. doi: 10.3389/fphar.2021.639840
8. Kim DI, Lee SJ, Lee SB, Park K, Kim WJ, Moon SK. Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression. *Carcinogenesis*. 2008;29(9):1701-1709. doi: 10.1016/j.pnrl.2017.11.001
9. Pereira GLDC, Almeida TC, Seibert JB, Amparo TR, Soares RDOA, Rodrigues IV, et al. Antitumor effect of *Cymbopogon densiflorus* (Linneus) essential oil in bladder cancer cells. *Nat Prod Res*. 2020; 2:1-5. doi: 10.1080/14786419.2020.1747453
10. Da Silva GN, de Castro Marcondes JP, de Camargo EA, Junior GASP, Sakamoto-Hojo, Salvadori DMF. Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010;235(7):814-824. doi: 10.1258/ebm.2010.009322

- 11.** Lima APB, Almeida TC, Barros TMB, Rocha LCM, Garcia CCM, Da Silva GN. Toxicogenetic and antiproliferative effects of chrysin in urinary bladder cancer cells. *Mutagenesis*. 2020;1(5):1-11. doi: 10.1093/mutage/geaa021
- 12.** Sávio ALV, Da Silva GN, Salvadori DMF. Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutat Res*. 2015;771:29-35. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.11.004
- 13.** Da Silva GN, De Camargo EA, Salvadori DMF. Toxicogenomic activity of gemcitabine in two TP53-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes. *Mol Biol Rep*. 2012;39(12):10373-10382. doi: 10.1007/s11033-012-1916-1
- 14.** Almeida TC, Guerra CCC, De Assis BLG, Soares RDOA, Garcia CCM, Lima AAL, et al. Antiproliferative and toxicogenomic effects of resveratrol in bladder cancer cells with different TP53 status. *Environ Mol Mutagen*. 2019;60(8):740-751. doi: 10.1002/em.22297
- 15.** Barros TMB, Lima APB, Almeida TC, Da Silva GN. Inhibition of urinary bladder cancer cell proliferation by silibinin. *Environ Mol Mutagen*. 2020;61(4):445-455. doi: 10.1002/em.22363
- 16.** Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000;455(1-2):81-95. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00065-8
- 17.** Achary PGR. Applications of quantitative structure-activity relationships (QSAR) based virtual screening in drug design: A review. *Mini Rev Med Chem*. 2020;20(14):1375-1388. doi: 10.2174/1389557520666200429102334
- 18.** Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
- 19.** Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:7320-7326. doi: 10.1074/jbc.M008363200
- 20.** Banjerdpongchai R, Wudtiwai B, Khawon P. Induction of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis by naringin. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3289-3294.
- 21.** Tsuboi A, Ohsawa S, Umetsu D, Sando Y, Kuranaga E, Igaki T, et al. Competition for space is controlled by apoptosis-induced change of local epithelial topology. *Curr Biol*. 2018;28(13):2115-2128. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.029
- 22.** Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019;39(1):1-17. doi: 10.1042/BSR20180992
- 23.** Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med*. 2005;110:21-28. doi: 10.1385/1-59259-869-2:021
- 24.** Tannock IF, Lee C. Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. *Br J Cancer*. 2001;84:100-105. doi: 10.1054/bjoc.2000.1538
- 25.** Xu C, Huang X, Huang Y, Liu X, Wu M, Wang J, et al. Naringin induces apoptosis of gastric carcinoma cells via blocking the PI3K/AKT pathway and activating pro-death autophagy. *Mol Med Rep*. 2021;24(5):772. doi: 10.3892/mmr.2021.12412
- 26.** Lin R, Hu X, Chen S, Shi Q, Chen H. Naringin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, inhibits β -catenin pathway and arrests cell cycle in cervical cancer cells. *Acta Biochim Pol*. 2020;67(2):181-188. doi: 10.18388/abp.2020_5182
- 27.** Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β -catenin signaling pathway. *Toxicol Lett*. 2013;220(3):219-228. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.006
- 28.** Walz S, Lorenzin F, Morton J, Wiese KE, Eyss BV, Herold S, et al. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*. 2014;511:483-487. doi: 10.1038/nature13473

- 29.** Zhou J, Xia L, Zhang Y. Naringin inhibits thyroid cancer cell proliferation and induces cell apoptosis through repressing PI3K/AKT pathway. *Pathol Res Pract.* 2019;215(12):152707. doi: 10.1016/j.prp.2019.152707
- 30.** Aroui S, Aouey B, Chtourou Y, Meunier AC, Fetoui H, Kenani A. Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma. *Chem Biol Interact.* 2016;244:195-203. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.011
- 31.** Ming H, Chuang Q, Jiashi W, Bin L, Guangbin W, Xianglu J. Naringin targets Zeb1 to suppress osteosarcoma cell proliferation and metastasis. *Aging.* 2018;10(12):4141-4151. doi: 10.18632/aging.101710
- 32.** Tan TW, Chou YE, Yang WH, Hsu CJ, Fong YC, Tang CH. Naringin suppress chondrosarcoma migration through inhibition vascular adhesion molecule-1 expression by modulating miR-126. *Int Immunopharmacol.* 2014;22(1):107-114. doi: 10.1016/j.intimp.2014.06.029
- 33.** Saleh M, Khalil M, Abdellateif MS, Ebeid E, Madney Y, Kandeel EZ. Role of matrix metalloproteinase MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) in the clinical progression of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology.* 2021;26(1):758-768. doi: 10.1080/16078454.2021.1978763
- 34.** Zhu J, Li Y, Chen C, Ma J, Sun W, Tian Z, et al. NF- κ B p65 overexpression promotes bladder cancer cell migration via FBW7-mediated degradation of RhoGDI α protein. *Neoplasia.* 2017;19(9):672-683. doi: 10.1016/j.neo.2017.06.002
- 35.** Bacanlı M, Başaran AA, Başaran N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chem Toxicol.* 2015;81:160-170. doi: 10.1016/j.fct.2015.04.01

doi: 10.30827/ars.v63i2.23641

Artículos originales

Estudio exploratorio de la participación en proyectos de investigación en Farmacias Comunitarias

Patient participation in research projects in Community Pharmacies: An exploratory study

Carlos Fuentes-Senise^{1,2}  0000-0002-6425-7556

Francisco Javier Ferreira Alfaya^{1,3}  0000-0002-6805-0608

Maria Elena Senise-Gómez⁴  0000-0002-7732-3399

Yasmin Cura^{1,5}  0000-0001-5038-0708

¹Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Doctorando en Farmacia Social, Granada, España.

²Farmacéutico comunitario. Farmacia Puente Ladrillo. Salamanca, España.

³Farmacéutico en Servicios Médicos del Centro Penitenciario de Melilla. Melilla España.

⁴Médico de Atención Primaria. Centro de salud Aldeadávila de la Ribera. Aldeadávila de la Ribera, Salamanca, España.

⁵Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Unidad de Farmacogenética Granada, España.

Correspondencia

Carlos Fuentes Senise
cfuentessenise@gmail.com

Recibido: 04.01.2022

Aceptado: 13.02.2022

Publicado: 21.04.2022

Financiación

No se ha obtenido financiación de ninguna fuente externa

Conflicto de intereses

No se declaran conflictos de intereses.

Resumen

Introducción: En los últimos años ha habido un incremento de la participación de farmacias comunitarias en proyectos de investigación. El reclutamiento de pacientes juega un papel clave en el éxito de las investigaciones. Se han identificado barreras y facilitadores que promueven dicho reclutamiento por parte de los farmacéuticos, pero poco es sabido sobre la influencia de factores relacionados con los proyectos de investigación. El objetivo de este trabajo es observar la participación en diferentes investigaciones llevadas a cabo en farmacias comunitarias e identificar las variables propias de los estudios que puedan estar asociadas con la participación.

Método: Se realizó un estudio multicéntrico experimental en 12 farmacias comunitarias que formaron parte de 4 proyectos de investigación. Se registró el número de pacientes que aceptaron/rechazaron participar. Se recogieron variables relacionadas con el estudio ofrecido y las farmacias. Se realizó un análisis bivalente mediante la prueba Chi-Cuadrado de Pearson y un análisis de los riesgos.

Resultados: La participación total fue del 90,44% (n=558). El tipo de estudio (OR=2,64; 95%IC=1,47-4,75; transversal vs pragmático), el tipo de medida aplicada (OR=2,47; 95%IC=1,43-4,36), la aplicación de zona de atención personalizada (ZAP) (OR=2,49; 95%IC=1,44-4,39), y la solicitud de datos personales (OR=2,53; 95%IC=1,47-4,42) mostraron asociación con la participación en los PI (p<0,05).

Conclusiones: La participación por parte de los pacientes en proyectos de investigación es elevado y parece depender de factores propios del estudio aplicado.

Palabras clave: Participación del paciente; Farmacia Comunitaria; Sujetos de investigación.

Abstract

Introduction: Over the last years there has been an increase in community pharmacy participation in research projects. Patient recruitment plays a key role in the research project success. Pharmacists' barriers and enablers of recruitment have been identified, but little is known about the influence of research project-related factors. The aim of this paper is to explore patient participation in different studies conducted in community pharmacies and to identify study-specific factors that may be associated with it.

Method: An experimental multicenter study was performed in 12 community pharmacies participating in 4 research projects. The number of patients who accepted/refused to participate was recorded. Variables related to each offered study and the project were collected. A bivariate analysis using Pearson's Chi-Square test and a risk analysis were performed.

Results: Participation rate was 90.44% (n=558). Study type (OR=2.64; 95%CI=1.47-4.75; cross-sectional vs pragmatic), the type of measurement applied (OR=2.47; 95%CI=1.43-4.36), the use of a personalized care area (PCA) (OR=2.49; 95%CI=1.44-4.39), and personal data request (OR=2.53; 95%CI=1.47-4.42) showed association with participation in the RP (p<0.05).

Conclusions: Patient participation in research projects is high and appears to rely on study-specific factors.

Keywords: Patient participation; Community pharmacy; Research subjects.

Puntos clave

Debido al alto número de ensayos clínicos y proyectos de investigación en el ámbito hospitalario y clínico, se han estudiado las variables que afectan a la aceptación de los sujetos a participar en los proyectos de investigación que allí se realizan. Hasta ahora se han centrado en investigar los factores que afectan al reclutamiento por parte de los pacientes y profesionales que los llevan a cabo más que a la participación en base a factores del estudio.

Desgraciadamente el número de investigaciones en farmacias comunitarias no es tan alto. Se tiene muy poca información respecto a la investigación y la realización de proyectos de investigación en farmacias comunitarias en España.

Este estudio identifica las características de los proyectos de investigación que parecen estar asociadas con la participación de los pacientes que acuden a farmacias comunitarias. En base a los resultados obtenidos, se identifican variables propias de los estudios que deberían tenerse en cuenta a la hora de diseñar estudios en farmacias comunitarias y los aspectos a tener en cuenta para el diseño de futuras investigaciones.

Introducción

La investigación en farmacias comunitarias (FC) ha experimentado un auge en los últimos años, demostrado por un marcado incremento de la participación en proyectos de investigación (PI)^(1,2).

La farmacia comunitaria se presenta como un establecimiento idóneo para la implantación de servicios profesionales farmacéuticos asistenciales (SPFA) y para la realización de estudios de investigación^(3,4). A su vez, los farmacéuticos comunitarios son profesionales sanitarios accesibles a la población, tienen un contacto regular con los pacientes a los que dispensan medicamentos periódicamente y son, en muchas ocasiones, el primer profesional de la salud al que acude el paciente, y en otras muchas el único profesional sanitario consultado⁽⁵⁾. Sin embargo, existen diversas barreras que dificultan el desarrollo de SPFA y PI en las FC como práctica habitual⁽⁶⁻⁸⁾. Algunas de las principales barreras detectadas en estudios anteriores son, falta de tiempo, de remuneración o de entrenamiento en investigación⁽⁷⁾. En ocasiones, el miedo al rechazo por parte del paciente juega un papel fundamental en los PI realizados en FC. En estudios previos que evaluaron las perspectivas de los farmacéuticos frente a su práctica habitual, se identificó una percepción negativa frente a la disposición que tiene el paciente a permanecer más tiempo del habitual en la farmacia. Los farmacéuticos creen que el paciente no quiere perder el tiempo en el establecimiento^(6,8).

Una baja tasa de participación en los PI incrementa el riesgo de sesgos y aumenta la probabilidad de que la muestra no sea representativa de la población general incrementando los errores tipo II^(9,10).

Bajo este marco conceptual, parece interesante estudiar la predisposición de los pacientes a participar en PI en farmacias e identificar potenciales factores implicados en la participación de los pacientes en proyectos realizados en FC que permitan dilucidar las posibles causas que condicionarían el rechazo a participar por parte de los pacientes. Con esta información, se podrán diseñar estudios que cuenten con características más propicias para mejorar las tasas de participación.

El objetivo de este trabajo es observar la participación en diferentes PI llevados a cabo en FC e identificar las variables propias de los estudios que puedan estar relacionadas con la participación.

Métodos

Diseño y participantes

Se realizó un estudio multicéntrico observacional, que incluyó los datos recogidos de 4 PI realizados en 12 FC que aceptaron participar, entre enero de 2018 y abril de 2021 en Salamanca (España).

Variables

Se contabilizó el número total de pacientes a los que se ofreció participar en los estudios y se categorizaron en Participa y No Participa.

Se recogieron las tipologías de la farmacia que ofertaba la participación (rural o urbana), el estudio que se ofrecía, el tipo de diseño aplicado, el tiempo promedio estimado requerido por parte del paciente para realizar el estudio correspondiente, el lugar dónde se realizaba dentro de la farmacia (ZAP o no ZAP). También, se registró la forma en la que se realizaron las mediciones (instrumental o cuestionario). Se consideró instrumental a todas aquellas mediciones que requirieron del uso de un dispositivo adicional al cuestionario (tensiómetro, báscula, talla, plicómetro, etc.). Adicionalmente, se registró si el estudio requería de firma de hojas de protección de datos personales.

Análisis

Se realizó un análisis descriptivo de frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas.

Posteriormente se compararon los grupos de pacientes Participantes y No Participantes mediante un análisis bivariante con el test de Chi-cuadrado de Pearson y un análisis del riesgo. Con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

Las características de los estudios incluidos se muestran en la Tabla 1. Del total de farmacias participantes, 6 (50%) se encontraban en medio urbano.

Tabla 1. Descripción de los proyectos de investigación incluidos.

Proyecto	#1	#2	#3	#4
Tiempo Estimado	>10 minutos	≤10 minutos	>10 minutos	≤10 minutos
Prueba	Instrumental	Cuestionario	Cuestionario	Instrumental
Tipo	Transversal	Transversal	Pragmático	Longitudinal
Localización	ZAP	No ZAP	No ZAP	ZAP
Datos Personales	No	No	Sí	Sí
Nº Farmacias	12	3	2	3
Muestra	293	85	178	61
Participa/No participa (%)	279 (95,2) / 14 (4,8)	75 (88,2) / 10 (11,8)	151(84,8) / 27 (15,2)	53 (86,9) / 8 (13,1)
Duración	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses

ZAP: Zona de Atención Personalizada

Se incluyeron 617 pacientes, de los cuales 558 (90,44%) aceptaron participar y 59 (9,56%) no aceptaron participar. Los resultados del análisis bivariante se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis bivalente.

	Muestra	Participa N (%)	No participa N (%)	p-valor*	OR	(IC95%)
Total	617	558(90,44)	59(9,56)	-	-	-
Tipo de estudio						
Pragmático	178	151(84,8)	27(15,2)	0,003	1	(1,47-4,75)
Transversal	378	354(93,7)	24(6,3)		2,64	(0,53-2,94)
Longitudinal	61	53(85,9)	8(13,1)		1,18	
Medida						
Cuestionario	263	226(85,9)	37(14,1)	0,001	1	(1,43-4,36)
Instrumental	354	332(93,8)	22(6,2)		2,47	
Tiempo						
≤10 minutos	146	128(87,7)	18(12,3)	0,193	-	-
>10 minutos	471	430(91,3)	41(8,7)			
Medio						
Urbano	379	341(90,0)	38(10,0)	0,675	-	-
Rural	238	217(91,2)	21(8,8)			
Zona						
No ZAP	262	225(85,9)	37(14,1)	0,001	1	(1,44-4,39)
ZAP	355	333(93,8)	22(6,2)		2,49	
Datos Personales						
Si	239	204(85,4)	35(14,6)	0,001	1	(1,47-4,42)
No	378	354(93,7)	24(6,3)		2,53	

SD: Desviación estándar; ZAP: Zona de Atención Personalizada; OR: Odd Ratio; IC: Intervalo de confianza. *Test Chi cuadrado. $\alpha=0,05$

Se encontró asociación significativa entre la aplicación de medidas instrumentales (OR=2,47; 95%IC=1,43-4,36; $p=0,001$), la ZAP (OR=2,49; 95%IC=1,44-4,39; $p=0,001$), el diseño de estudio transversal (OR=2,64; 95%IC=1,47-4,75; vs pragmático) y la no petición de datos personales (OR=2,53; 95%CI=1,47-4,42; $p=0,001$) con respecto a la participación de los pacientes. El tiempo requerido para realizar el estudio ($p=0,193$) y el medio ($p=0,675$) no resultaron ser factores estadísticamente significativos.

Discusión

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, esta es la primera recopilación de datos provenientes de diferentes PI para analizar la participación en FC de España.

La participación en los PI ha sido del 90,44%, reflejando una elevada predisposición a participar por parte de los pacientes.

Los estudios transversales han presentado una mayor participación (p -valor= 0,003), esto podría deberse a que requieren una única visita al contrario de los otros diseños. Además, ésta visita suele realizarse cuando el paciente acude al servicio de dispensación habitual en su farmacia comunitaria. Al contrario que lo sugerido por Arfken et al.⁽¹¹⁾ el realizar un seguimiento del paciente ha provocado un descenso de la participación. Esto puede deberse a que la toma de medidas en los estudios transversales incluidos se realizaba aprovechando que el paciente acudía a la farmacia comunitaria, mientras que la realización del seguimiento implica una participación más activa del paciente, obligándole a

acudir de nuevo a las FC (estudio #2) o contestando a llamadas telefónicas (estudio #3). Esto es similar a lo propuesto por otros autores, cuando el estudio exige o demanda más del paciente, la participación desciende⁽¹²⁾. Es importante señalar que del total de PI incluidos en nuestro estudio (n=4), un 50% correspondió a estudios transversales que forman un 61,3% (n=378) de la muestra total de pacientes, pudiendo haber influido en los resultados obtenidos.

Se ha observado que los PI en los que se realizan medidas mediante instrumentación tienen una mayor participación que en aquellos en los que solo se realizan cuestionarios (OR=2,47; 95%IC=1,43-4,36; p=0,001). Otros autores ya han evaluado que el uso de la palabra “encuesta” o “cuestionario” reduce la participación y la proporción de participantes⁽¹³⁾. El uso de instrumentos más allá de los cuestionarios puede ser visto como una recompensa por parte del paciente, este método ha demostrado incrementar la participación en estudios anteriores^(13,14).

La realización del PI en la ZAP parece incrementar la participación (OR=2,49; 95%IC=1,44-4,39; p=0,001). Muchas de las tareas de la farmacia comunitaria se realizan a pie de mostrador. Dentro de estas tareas pueden encontrarse la realización de cuestionarios para PI. Sin embargo, la realización de estos PI en la ZAP puede brindar un ambiente de mayor intimidad y, por ende, más adecuado para la recogida de datos.

Los PI que no requerían la firma de un documento para la recopilación de datos personales presentaron mayor participación que aquellos que sí la solicitaron (OR=2,53; 95%CI=1.47-4.42; p=0,001). Podría deberse a una reticencia por parte del paciente, en primer lugar, a dar datos personales, y, en segundo lugar, a firmar un documento. Esta situación ha sido documentada previamente⁽¹²⁾. Esta potencial barrera podría afrontarse mejorando la explicación de los PI y la importancia de la Hoja de Protección de Datos Personales a los pacientes. El comportamiento del farmacéutico durante sus encuentros con el paciente es uno de los factores que predispone a la participación activa, tanto en PI como en actividades diarias de las FC (dispensación de medicamentos y seguimiento)⁽¹⁵⁾.

El tiempo promedio de los estudios no se asoció con la participación observada (p-valor=0,193), aun cuando ésta variable era una de las principales barreras que percibían los farmacéuticos a la hora de reclutar pacientes⁽⁶⁻⁸⁾. Según los datos obtenidos por nuestro estudio, parece ser que esta afirmación es más bien una percepción proveniente del farmacéutico que dista de la predisposición real de los pacientes a participar. Como se ha visto anteriormente, el reclutamiento de pacientes para PI en farmacia comunitaria depende más de la predisposición del farmacéutico que de los propios pacientes⁽¹⁶⁾.

Como principal limitación de nuestro trabajo podríamos mencionar que únicamente nos hemos enfocado en el diseño del estudio como factor influyente en la participación de los pacientes en PI. Cuando existen otras variables relacionadas con el farmacéutico y el paciente⁽¹⁷⁾. Otro punto por señalar es que en este estudio no se ha registrado la presencia o no de un reclutamiento mínimo. Factor propio de los estudios que puede generar una mayor tasa de reclutamiento de pacientes⁽¹⁷⁾.

Conclusión

La participación de los pacientes en los PI realizados en FC es alto. Podemos afirmar que las FC son un buen lugar para la recogida de datos de PI.

La participación parece depender de factores propios del estudio como el diseño, el uso de instrumentos de medición, la zona en la que se lleva a cabo y de la documentación que se solicita al paciente. Aparentemente, el tiempo que requiere al paciente para realizar el estudio no es un factor que influya en la participación.

Sería interesante para futuros trabajos, realizar un análisis global, que también considere factores propios del farmacéutico y los pacientes.

Bibliografía

1. Andrés Iglesias JC, Andrés Rodríguez NF, Fornos Pérez JA. Community pharmacy-based research in Spain (1995-2005): A bibliometric study. *Pharm Pract Internet* 2007;5:21-30. Doi: 10.4321/s1886-36552007000100004.
2. Saavedra-Mitjans M, Ferrand É, Garin N, Bussières J-F. Role and impact of pharmacists in Spain: a scoping review. *Int J Clin Pharm* 2018;40:1430-42. Doi: 10.1007/s11096-018-0740-7.
3. García-Cárdenas V, Gastelurrutia MA, Malet-Larrea A, Peiró T, Pérez-Escamilla B, Saez-Escamilla B, et al. AdherenciaMED Project: Design, impact assessment and implementation of a professional service for therapeutic adherence at the community pharmacy setting. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos ; 2019 ISBN: 978-84-87089-12-1
4. Castillo D, Burgos F, Gascón MP. El papel de las farmacias comunitarias en el control de las enfermedades respiratorias. *Archivos De Bronconeumología* 2015;51:429-30. Doi: 10.1016/j.arbres.2015.06.003.
5. Melton BL, Lai Z. Review of community pharmacy services: what is being performed, and where are the opportunities for improvement? *Integr Pharm Res Pract* 2017;6:79-89. Doi: 10.2147/ipp.s107612.
6. Bertilsson E, Serhal S, Emmerton L, Bosnic-Anticevich S, Krass I, Bereznicki B, et al. Pharmacists experience of and perspectives about recruiting patients into a community pharmacy asthma service trial. *Res Soc Administrative Pharm* 2021;17:595-605. Doi: 10.1016/j.sapharm.2020.05.012.
7. Crilly P, Patel N, Ogunrinde A, Berko D, Kayyali R. Community Pharmacists' Involvement in Research in the United Kingdom. *Pharm* 2017;5:48. Doi: 10.3390/pharmacy5030048.
8. Gastelurrutia MA, Benrimoj SIC, Castrillon CC, Amezua MJC de, Fernandez-Llimos F, Faus MJ. Facilitators for practice change in Spanish community pharmacy. *Pharm World Sci* 2009;31:32-9. Doi: 10.1007/s11096-008-9261-0.
9. Kypri K, Samaranyaka A, Connor J, Langley JD, Maclennan B. Non-response bias in a web-based health behaviour survey of New Zealand tertiary students. *Prev Med* 2011;53:274-7. Doi: 10.1016/j.ypmed.2011.07.017.
10. Madigan MP, Troisi R, Potischman N, Brogan D, Gammon MD, Malone KE, et al. Characteristics of respondents and non-respondents from a case-control study of breast cancer in younger women. *Int J Epidemiol* 2000;29:793-8. Doi: 10.1093/ije/29.5.793.
11. Arfken CL, Balon R. Declining Participation in Research Studies. *Psychother Psychosom* 2011;80:325-8. Doi: 10.1159/000324795.
12. Ross S, Grant A, Counsell C, Gillespie W, Russell I, Prescott R. Barriers to Participation in Randomised Controlled Trials A Systematic Review. *J Clin Epidemiol* 1999;52:1143-56. Doi: 10.1016/s0895-4356(99)00141-9.
13. Bower P, Brueton V, Gamble C, Treweek S, Smith CT, Young B, et al. Interventions to improve recruitment and retention in clinical trials: a survey and workshop to assess current practice and future priorities. *Trials* 2014;15:399. Doi: 10.1186/1745-6215-15-399.
14. Groth SW. Honorarium or coercion: use of incentives for participants in clinical research. *J New York State Nurses' Assoc n.d.*;41:11-3; quiz 22.
15. Qudah B, Thakur T, Chewing B. Factors Influencing Patient Participation in Medication Counseling at the Community Pharmacy: A Systematic Review. *Res Soc Administrative Pharm* 2021;17:1863-76. Doi: 10.1016/j.sapharm.2021.03.005.
16. Macfarlane H, Maidment I. Recruiting people with severe mental illness through community pharmacies: real-world experiences from a UK study. *Bmc Fam Pract* 2020;21:172. Doi: 10.1186/s12875-020-01243-5.

17. Stewart D, Madden M, Dongen AV, Watson M, Morris S, Whittlesea C, et al. Process study within a pilot cluster randomised trial in community pharmacy: An exploration of pharmacist readiness for research. *Res Soc Administrative Pharm* 2021;17:1750–7. Doi: 10.1016/j.sapharm.2021.01.005.

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i2.21983

Artículos originales

Validation of three analytical methods for quantification of acetaminophen by UV spectrophotometry

Validación de tres métodos analíticos para cuantificación de acetaminofén mediante espectrofotometría UV

Balbina S Delgado-Gómez¹

Nadia L López-Espinosa¹

Veronica Castro-Bear²  0000-0002-5056-8564

Oscar Zuñiga-Lemus¹  0000-0001-5874-7041

¹Universidad de la Cañada. Carretera Teotitlán - San Antonio Nanahuatipán Km 1.7 s/n., Paraje Titlacuatitla. Teotitlán de Flores Magón, Oax. México.

²BUAP, Complejo Regional Sur. Carretera Libramiento Tecnológico-San Marcos Necoxtla, K.m 7 5, Lázaro Cárdenas Sur, 75859, Puebla, México.

Correspondencia

Oscar Zuñiga Lemus
oscarlemus@unca.edu.mx

Recibido: 08.11.2021

Aceptado: 19.02.2022

Publicado: 21.04.2022

Agradecimientos

No acknowledgments.

Financiación

No financing.

Conflicto de intereses

The authors declare that there is no conflict of interest.

Resumen

Introducción: El acetaminofén es un analgésico y antipirético no esteroideo, cuyo mecanismo se basa en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa responsable de la aparición de dolor e inflamación. En México es uno de los fármacos ampliamente usados por su efectividad, es por ello, el objetivo de este estudio fue implementar un método de validación química por espectrofotometría ultravioleta que permita la cuantificación de este principio activo.

Método: Se trabajó con 4 medios de disolución (HCl:MetOH 0,1N, HCl 0,1M, Metanol: Agua en proporción 15:85 p/v y solución amortiguadora de fosfatos 0,2M). Los cuatro medios se sometieron a una validación analítica, midiendo Significancia de la regresión lineal, precisión, estabilidad de la muestra y sensibilidad.

Resultados: Los medios HCl 0,1M, MetOH:H₂O (15:85 v/v) y Buffer de fosfatos cumplen con la significancia del intercepto, linealidad del método, así como los parámetros de precisión, estabilidad y con los límites de detección (DL) y el límite de cuantificación (QL). Descartando el medio de HCl: MetOH 0,1N por no cumplir con los parámetros de linealidad.

Conclusiones: De los cuatro medios evaluados tres de ellos (HCl 0,1M, Metanol: agua y amortiguador de fosfatos) se pueden usar como alternativas en la cuantificación de este fármaco.

Palabras clave: Acetaminofén; Validación; Norma Oficial Mexicana (NOM).

Abstract

Introduction: Acetaminophen is a non-steroidal analgesic and antipyretic, whose mechanism is based on the inhibition of the cyclooxygenase enzyme responsible for the appearance of pain and inflammation. In Mexico, it is one of the drugs widely used for its effectiveness, which is why the objective of this study was to implement a method of chemical validation by ultraviolet spectrophotometry that allows the quantification of this active principle.

Method: We worked with 4 dissolution media (HCl: 0.1N MeOH, 0.1M HCl, Methanol: Water in a ratio of 15:85 p / v and 0.2M phosphate buffer). All four media underwent analytical validation, measuring linear regression significance, precision, sample stability, and sensitivity.

Results: The 0.1M HCl, MeOH: H₂O (15:85 v / v) and Phosphate Buffer media comply with the significance of the intercept, linearity of the method, as well as the parameters of precision, stability, and with the limits of detection (DL) and the limit of quantification (QL). Discarding the HCl: 0.1N MeOH medium for not meeting the linearity parameters.

Conclusions: Of the fourth means evaluated, three of them (0.1M HCl, Methanol: water, and phosphate buffer) can be used as alternatives in the quantification of this drug.

Key Words:Acetaminophen, validation, Official Mexican Standard (NOM)

Highlight

Paracetamol is one of the most consumed drugs in Mexico, which is why it is necessary to have ways to quantify the concentration of this active ingredient when an HPLC is not available.

The work demonstrates the validation of three dissolution media with which paracetamol can be quantified as an alternative to verify its quality control.

Introduction

Paracetamol or acetaminophen is a non-steroidal analgesic and antipyretic, whose mechanism of action is based on the inhibition of the cyclooxygenase enzyme, preventing the formation of prostaglandins responsible for the appearance of pain⁽¹⁾. Due to its demand among the population, acetaminophen is a focus of constant research since it is one of the most widely used analgesics in Mexico with sales of more than 600 million boxes per year⁽²⁾.

Chemical validation is a process by which the applicability of an analytical method is evidenced, which consists of documented evidence that demonstrates the probability that the method used is reliable⁽³⁾. The Pharmacopoeia of the United Mexican States (FEUM) describes validation as a “process that establishes, through laboratory studies, which performance characteristics of the method meet the re-

quirements for its analytical application”, within the performance characteristics mentioned; system verification, system precision, system linearity, method specificity/selectivity, method accuracy, method linearity and range, method precision, method detection limit, method limit of quantification and method tolerance⁽⁴⁻⁶⁾.

The first validations began to have a boom in the early '90s, and have been used by different regulatory bodies such as the United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registry of Medicines for Human Use (ICH), the Food and Drug Administration (FDA), and in Mexico the Pharmacopoeia of the United Mexican States (FEUM). These are of great importance since they provide guidelines to develop validations, mainly of pharmaceutical methods in the development of new drugs, or when reformulating a pharmaceutical preparation providing an alternative analysis for drugs whose form can be very complex or involves expensive equipment^(7,8).

In Mexico, standards have been issued, especially the NOM-059-SSA1-2015, which establishes the Good Manufacturing Practices of Medicines, and the NOM-177-SSA1-2013^(6,9), which establishes the tests to demonstrate that medicine is interchangeable, both contribute to the validation of analytical methods, to demonstrate that the analytical procedure is adequate for the indicated purpose,⁽¹⁰⁾ providing evidence that demonstrates whether the analytical procedures subjected to validation achieve the specifications provided by the manufacturers or institution of reference⁽¹¹⁾. On the other hand, validation ensures the quality of manufactured drugs, likewise, reduces the possibility of rejections and/or reprocesses, optimizes processes, among other benefits⁽¹²⁾.

Methods

Reagents

Hydrochloric acid (HCl) brand Sigma-Aldrich, Methanol (CH₃OH, MeOH) brand Meyer Chemical Reagents, Sodium hydroxide (NaOH) brand Sigma-Aldrich, Monobasic potassium phosphate (KH₂PO₄ + H₂O) brand Meyer, potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) brand Reactivos Químicos Monterrey SA, Sulfuric acid (H₂SO₄) brand Reactivos Química Meyer.

Preparation of dissolution media

The first dissolution medium consisted of a mixture of HCl: MeOH both in 0.1N concentration in a 1: 1 ratio. The second medium consisted of Sigma-Aldrich brand 0.1M HCl. For the third medium, a mixture of Methanol: Water in a ratio of 15:85 v / v was used. The fourth medium consisted of a 0.2M phosphate buffer solution, pH 5.8. Once the solutions were prepared, they were stored at 4°C until use.

UV-Vis Spectrophotometer Verification

Two types of equipment were used, one from the Velab UV / Vis brand, model VE-5600UVPC, and the second from the Perkin Elmer Precisely UV / Vis brand, Lambda 35 model. Verifying the operation of the photometric scale using a potassium dichromate solution that was prepared according to what is specified in the Pharmacopoeia of the United Mexican States⁽¹³⁾.

Cleaning glassware

To avoid any interference from residues in the glassware, all the glassware was washed using a chromic mixture which was prepared according to FEUM⁽¹⁴⁾. All the glassware used was washed with the mixture for 24 hours, after the time the glassware was washed with tap water and then rinsed with distilled water.

For this work, quartz cells from Daigger® Scientific were used. Which were rinsed with distilled water and subsequently washed with methanol. When a deep cleaning was needed, it was increasingly used: warm distilled water, 2% (v / v) hydrochloric acid solution, alcohol, acetone, and 15% hydrochloric acid solution⁽¹⁴⁾.

Validation of the analytical method

The validation of the analytical methodologies was carried out under the provisions of NOM-177-SSA1-2013⁽¹⁵⁾ and the ICH (International Conference on Harmonization) guide⁽¹⁶⁾. Evaluating the parameters of linearity, precision, sample stability, and sensitivity.

To evaluate the linearity of each system, a calibration curve was prepared in triplicate for three days with six different concentrations, as a calibration blank the dissolution medium was used according to the system, to obtain the maximum wavelength absorption was scanned from 200 to 400 nm⁽⁶⁾.

For the calibration curves, the following solutions were prepared, medium of 0.1N HCl dissolution in methanol 1: 1, for this medium the preparation of the acetaminophen Stock was carried out the following methodology, 50mg of the reference drug was weighed and transferred to A volumetric flask of 100 mL was dissolved with the previously prepared dissolution medium, it was capped to obtain a concentration of 0.5mg/mL. The calibration curve consisted of concentrations from 0.5 to 16 µg/mL, reading at an absorbance of 257nm. For the second methodology with the 0.1M HCl dissolution medium, 25 mg of the same reference drug were weighed and transferred to a 50 mL volumetric flask, filling with the previously prepared dissolution medium to obtain a concentration of 0.5mg / mL, 20 mL were taken from this stock solution and poured into a 100 mL volumetric flask and in the same way, it was gauged with the same dissolution medium having a final concentration of 100µg/L, the calibration curve consisted of concentrations of 2mg to 14mg/L acetaminophen, reading at an absorbance of 242 nm. For the third and fourth validation method MeOH: H₂O (15:85 v / v) and phosphate buffer pH 5.8; 20 mg of the reference paracetamol was weighed and transferred to a 100 mL volumetric flask, it was dissolved with the medium of dissolution and gauged to obtain a concentration of 0.2mg/mL of the active principle, the calibration curves were constructed using concentrations of 2.5 to 14 ppm of acetaminophen, in this case, both curves were read at 243nm. All systems were prepared in triplicate, for three consecutive days.

With the data of the curves it was determined: the slope (m), the ordinate to the origin (b), the correlation coefficient (r), the determination coefficient (r²), to calculate the Relative Error due to the Regression, using the equation 1⁽¹⁵⁾.

$$ERR\% = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100\%$$

equation 1.

In all cases the NOM indicates that in the curves the “r” must be greater than or equal to 0.99 and the ERR% must not be greater than 2%.

Significance of linear regression

To corroborate the significance of the linear regression⁽¹⁷⁾, a statistical t-student test was performed, calculating the significant linear correlation (t_r or t_{exp}), the value of the experimental t with n- 1 degree of freedom and a 95% confidence interval using the equation 2.

$$t_r = \frac{|r| \cdot \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

equation 2.

To calculate “r” was used the equation 3.

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}\right) \left(\frac{\sum y^2 - (\sum y)^2}{n}\right)}}$$

equation 3.

To calculate the coefficient of determination and demonstrate linearity, the acceptance criteria used were $n-1$ degrees of freedom and a $p = 0.05$ (two tails) considering a coefficient of determination greater than or equal to $t_{0.98}$ and with a t_{exp} greater than the t_{table} .

Similarly, a hypothesis test was performed for the slope, where the variance of the slope was calculated using the equation 4.

$$S_b^2 = \frac{S^2_{x,y}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

equation 4.

In all cases to determine the variance of the total experimental error, was used the equation 5.

$$s^2_{x,y} = \frac{\sum (y - y')^2 (1 - r^2)}{n - 2}$$

equation 5.

In the same way, to know the standard deviation of the slope, it was calculated using the equation 6.

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

equation 6.

And for the standard deviation of the intercept, was used the equation 7

$$S_b \text{ rel (\%)} = \frac{S_b \times 100}{b}$$

equation 7.

The confidence limits of the slope and the intercept were calculated based on $b \pm t_{table} \times S_b$ considering the value of t_{table} for an $n-1$ degrees of freedom with a significance of $\alpha = 0.05$. The value of experimental t (t_{exp}) of both the slope and the intercept were calculated based on the equation 8.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

equation 8.

For both cases the acceptance criteria were considering $n-1$ degrees of freedom and $\alpha = 0.05$ and with acceptance criteria with a slope significantly different from zero and the t_{exp} must be greater than t_{tables} . The intercept calculation was carried out through a proportionality test using a t-test, or this, the variance of the intercept was found through the equation 9⁽¹⁸⁾.

$$s_a^2 = \frac{s^2_{x,y} (\sum x^2)}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

equation 9.

Precision

For the data obtained, the Response Factor (Fr) was calculated as $Fr = Abs/Conc$, from which the Percentage Variation Coefficient (CV%) of all the data of the system was determined. Considering acceptable with a CV% no greater than 2%.

Sample stability

To determine the analytical stability of acetaminophen (active principle) in dissolution media, triplicate solutions of the drug (acetaminophen) were prepared, taking into account the maximum and minimum concentrations of the calibration curves already described. The samples were kept at room temperature for 8 hours reading the absorbances every 2 hours, as well as in refrigerated solutions at 4°C for 48 hours reading the absorbances at 0, 2, 4, 6, 8, 24, and 48 hrs.

The limit calculation for a stability study in an analytical solution was determined by the equation 10.

$$\frac{\text{Initial standard absorbance} - \text{Standard absorbance (at different times)}}{\text{Initial standard absorbance}} \times 100$$

equation 10.

Sensitivity

The detection limit (DL) was determined with the standard deviation of the response and the slope using the following equation $DL = (Y + 3\sigma) / S$. For the quantification limit (QL), it was calculated using the standard deviation of the response and the slope through the following equation $QL = (Y + 10\sigma) / S$. For this, 10 individual measurements of the blank were prepared, that is, of each of the dissolution media, obtaining average and standard deviation. Subsequently, the formulas described were applied to obtain the DL and QL.

Results and Discussion

To ensure the initially obtained results, the correct operation of the spectrophotometers was verified according to the FEUM. As can be seen in Table 1, the absorbances obtained from the Velab and Perkin Elmer Precisely Lambda 35 UV / Vis spectrophotometer are within the accepted tolerance.

Table 1. The photometric scale of potassium dichromate in UV / Vis Spectrophotometer.

Wavelength	Absorbance		Accepted tolerance	$E_{1\%}^{1cm}$		Results
	Velab	Perkin Elmer		Velab	Perkin Elmer	
235 nm (mínimo)	0.747	0.7514	0.740 – 0.756	123.3	124.0	Meet
257 nm (máximo)	0.864	0.8739	0.856 – 0.874	142.6	144.2	Meet
313 nm (mínimo)	0.293	0.294	0.289 – 0.295	48.3	48.5	Meet
350 nm (máximo)	0.642	0.6451	0.634 – 0.646	105.9	106.5	Meet

Figure 1 shows the spectral sweeps of acetaminophen in 0.1 M HCl (a), MeOH: H₂O (15:85 v / v) (b), and in phosphate buffer pH 5.8 (c) as means of solution, in all cases at a concentration of 10.0 ppm and in triplicate. Resulting in a maximum absorbance of acetaminophen in 0.1 M HCl of 242 nm and 243 nm, for the other two media, it is possible to see that there are no interferences in all spectra.

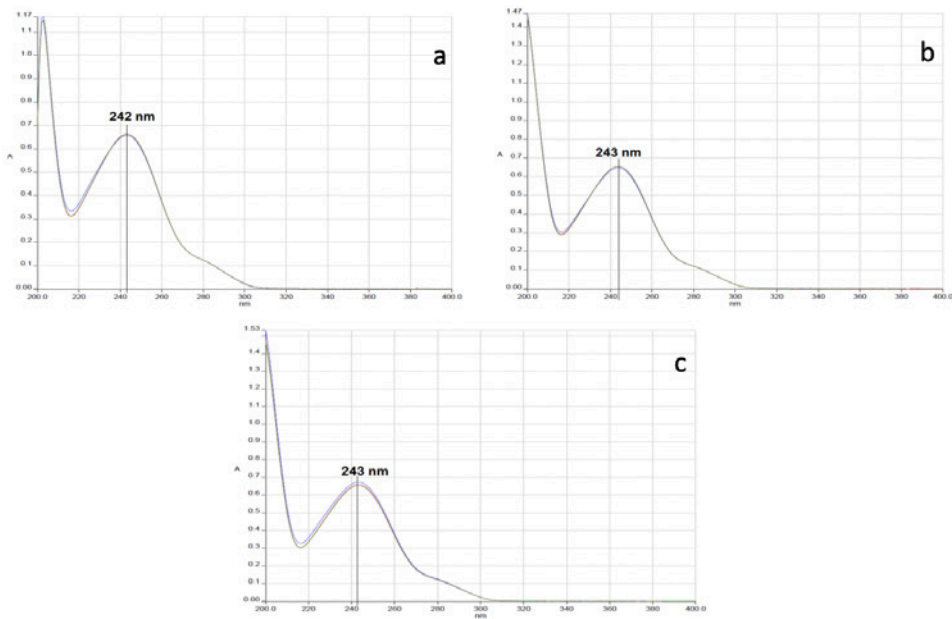


Figure 1. Acetaminophen scans with different dissolution media. a) 0.1 M HCl, b) MeOH: H₂O (15:85 v / v), and c) in phosphate buffer pH 5.8.

Table 2 shows the results of the linearity parameter, observing that the dissolution medium HCl: MeOH 0.1 N (1: 1), complies with the correlation coefficient (r), however the error due to the regression does not comply with the established in NOM-177-SSA1-2013 being greater than 2% (% ERR), so this medium was discarded for the following tests.

Table 2. The overall result of the validation of the drug for the linearity parameter.

Parameter	HCl:MeOH 0.1 N (1:1)	HCl 0.1 M	MeOH:H ₂ O (15:85 v/v)	Phosphate buffer pH 5.8	Acceptance requirements
R	0.9993	1.0000	1.0000	1.0000	$r \geq 0.99$
R ²	0.9985	0.9999	0.9999	0.9999	$R^2 \geq 0.98$
Ordenada (b)	0.0261	0.0005	-0.0056	0.0067	
Pendiente (m)	0.0417	0.0665	0.0708	0.0694	
%ERR	3.33	0.49	0.41	0.55	$ERR \leq 2\%$

According to NOM-177-SSA1-2013, a calibration curve was prepared in triplicate for three days with three concentrations described in the methodology, specifically in the validation section with the drug of this project (Figure 2).

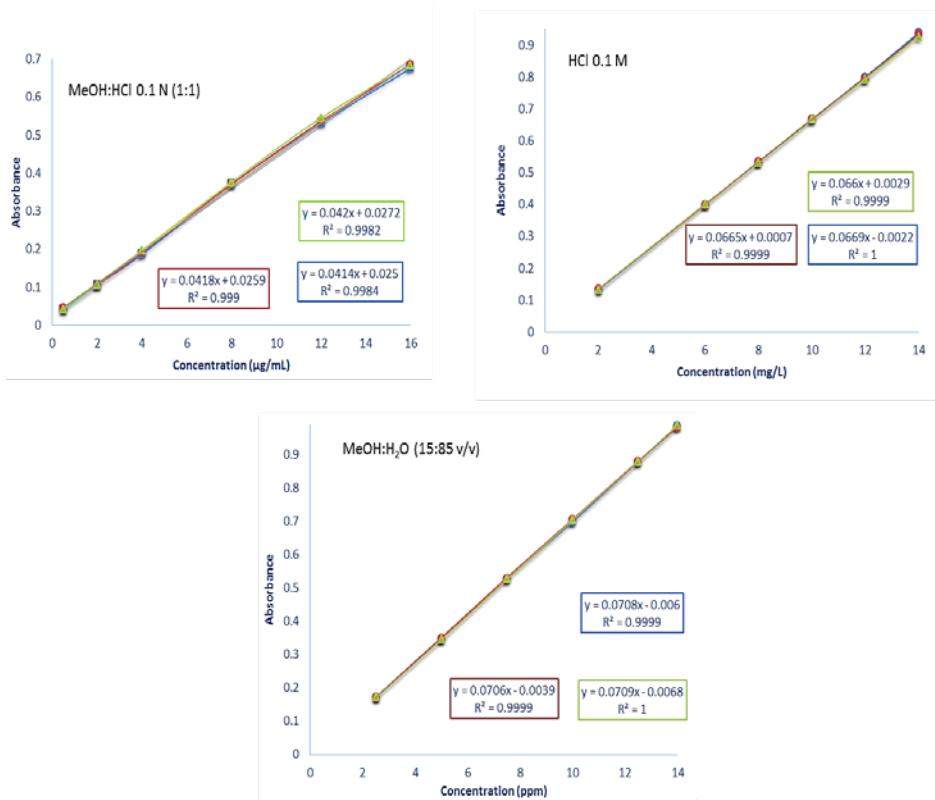


Figure 2. Calibration curve of acetaminophen with the three dissolution medium HCl: MeOH 0.1 N (1: 1), HCl 0.1M and MeOH:H₂O (15:85) during the three days.

Figure 2 and table 3 shows the results of calibration curve of acetaminophen and the linearity test for the active principle in the three-dissolution media. With the 0.1M HCl medium, an R2 (coefficient of determination) of 0.9794 and a correlation coefficient (r) of 1.0000 can be observed. However, the coefficient of determination is less than the acceptance criterion ($R^2 \geq 0.98$), however, the t_{exp} is greater than t_{table} , showing that there is a significant correlation between the variables. In the methanol: water medium and the phosphate medium, a coefficient of determination of 0.99951 and 0.9949 respectively was obtained, the coefficient of determination and the correlation coefficient is greater than the acceptance criterion, it is possible to appreciate that in the three media there is a significant correlation between concentration and absorbance because in the three cases the t_{exp} is greater than the t_{table} . All calibration curves show a high and very high Pearson correlation coefficient with values ranging from 0.9982 to 1.0.

Table 3. Results of the linearity test of the active principle in the different dissolution media.

Linearity test of the active principle							
	Parameter	Estimation	Standar error	Valor t	t_{table} n:17 α :0.05	Acceptance requirements	Results
Dissolution media HCl 0.1M	Linearity test						
	R ²	0.9794				$R^2 \geq 0.98$	Does not meet
	r	1				$r \geq 0.99$	Meet
	Linearity			13.93	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Meet
	Solpe test						
	Slope	0.152	0.0057	26.7	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Meet
	Proportionality test						
	Intercept	0.0477	0.0325	1.46	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Does not meet
Dissolution media MeOH:H ₂ O (15:85 v/v)	Linearity test						
	R ²	0.9951				$R^2 \geq 0.98$	Meet
	r	1				$r \geq 0.99$	Meet
	Linearity			28.64	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Meet
	Solpe test						
	Slope	0.1668	0.003	55.32	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Meet
	Proportionality test						
	Intercept	0.018	0.017	1.03	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Does not meet

Linearity test of the active principle							
Medio de Dissolution media Phosphate buffer pH 5.8	Parameter	Estimation	Standar error	Valor t	t_{table} n:17 α :0.05	Acceptance requirements	Results
	Linearity test						
	R ²	0.9949				R ² ≥ 0.98	Meet
	r	1				r ≥ 0.99	Meet
	Linearity			28	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Meet
	Solpe test						
	Slope	0.1637	0.003	54.09	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Meet
	Proportionality test						
	Intercept	0.0305	0.0173	1.77	2.11	$t_{exp} > t_{table}$	Does not meet

On the other hand, in the same table, the results of the slope test are shown, in the three means used the t_{exp} is greater than t_{tables} , therefore the slope is significantly different from zero, with a significance level of 95%.

Continuing in the same table, the significance of the intercept was verified employing a hypothesis test. In this case the three evaluated means, the t_{exp} is less than the table (2.11), therefore, the ordinate to the origin is significantly different from zero, consequently, the intercept does not meet the acceptance criterion, that is, there is no proportionality between the concentration and the absorbance of the method.

The overall result of the validation with the drug follows that stipulated in the NOM-177-SSA1-2013⁽⁶⁾ standard, having a coefficient of determination of 0.9999 and a correlation coefficient of 1.0000 corresponding to the three-dissolution media. Therefore, they are within the established, derived from this it is possible to say that the dissolution media are suitable to be used in the validation of acetaminophen (medicine). Although, it should be noted that when performing the linearity test, in the 0.1 M HCl dissolution medium, the coefficient of determination (R²) is lower than that marked.

To evaluate the precision of the methods, with the data obtained, the Response Factor (Fr) was calculated as $Fr = Abs / Conc$, from which the Percentage Variation Coefficient (CV%) of all the data was determined. of the system. The acceptance criteria established by NOM-177-SSA1-2013 mentions that the CV% should not be greater than 2%.

Table 4 shows the results of the precision parameter for validation with the drug with each dissolution medium, in all cases the NOM-117-SSA1-2013⁽⁶⁾ is met. The 0.1 M HCl dissolution medium is the most accurate, with a coefficient of variation of 0.41%.

Table 4. Results of the precision parameter for the validation with the drug in the dissolution media.

Dissolution media	Average	SD	%CV	Acceptance requirements	Results
HCl 0.1 M	0.0666	0.0003	0.41	CV ≤ 2%	Meet
MeOH:H ₂ O (15:85 V/V)	0.0699	0.0007	1		Meet
Phosphate buffer pH 5.8	0.0704	0.0006	0.86		Meet

To demonstrate the stability of the sample in the dissolution media, acetaminophen solutions were prepared in triplicate, which was kept at room temperature for 8 hours, thus under refrigeration for 48 hours. The acceptance criteria established by the ICH mentions that for the limit of a stability study in an analytical solution it must be between the recovery percentage, that is, 98-101.0% indicated in the monograph of acetaminophen in the FEUM⁽¹⁹⁾.

Table 5 shows the results of the stability parameter of acetaminophen in 0.1 M HCl, MeOH: H₂O (15:85 v / v), and phosphate buffer pH 5.8 as dissolution medium. It is possible to see that both at room temperature after 8 hours, and in refrigeration after 48 hours, the quantified% exceeds the 98% stipulated by the standard.

Table 5. Results of the stability parameter of the sample with the dissolution medium HCl 0.1 M, MeOH: H₂O (15:85 v / v), and phosphate buffer pH 5.8.

Sample stability with dissolution media					
	Time (hrs)	% de lo etiquetado		Acceptance requirements	Results
		2 mg/mL	14 mg/mL		
Dissolution media HCl 0.1 M.	0	99.9	99.7	98-101.0%	Meet
	2	99.7	99.4		Meet
	4	99.3	99.3		Meet
	6	99.1	99		Meet
	8	98.8	98.5		Meet
	Refrigerated solutions				
	24	99.8	99.3		Meet
	48	99.6	99.1		Meet
	Time (hrs)	% de lo etiquetado		Acceptance requirements	Results
		2.5 ppm	14 ppm		
Dissolution media MeOH:H ₂ O (15:85 v/v).	0	100	99.9	98-101.0%	Meet
	2	99.8	99.7		Meet
	4	99.5	99.3		Meet
	6	99.3	99.1		Meet
	8	98.5	98.7		Meet
	Refrigerated solutions				
	24	99.7	99.6		Meet
	48	99.5	99.4		Meet

Sample stability with dissolution media					
	Time (hrs)	% de lo etiquetado		Acceptance requirements	Results
		2.5 ppm	14 ppm		
Dissolution media Phosphate buffer pH 5.8.	0	99.8	99.9	98-101.0%	Meet
	2	99.5	99.7		Meet
	4	99.4	99.5		Meet
	6	99.2	98.9		Meet
	8	98.9	98.7		Meet
	Refrigerated solutions				
	24	99.8	99.9		Meet
	48	99.6	99.7		Meet

To evaluate the sensitivity parameter, it was performed according to what is established in the ICH guide (International Conference on Harmonization) by preparing 10 individual measurements of the blank, that is, of each of the dissolution media and their average was obtained and its standard deviation.

The sensitivity values obtained are shown in table 6 where it is possible to appreciate the detection and quantification limits estimated from the calibration curve for the linearity of each dissolution medium, the 0.1M HCl medium being the most sensitive.

Table 6.- Result of the detection limit (DL) and quantification limit (QL) with their respective dissolution media

Dissolution media	DL	QL
HCl 0.1 M	0.40 mg/L	0.85 mg/L
MeOH:H ₂ O (15:85 v/v)	0.43 ppm	0.84 ppm
Phosphate buffer pH 5.8	0.70 ppm	0.85 ppm

Conclusions

The objective of validation is to demonstrate through laboratory studies the ability to provide, in a continuous and reproducible way, homogeneous products according to quality specifications. In this work, 4 analytical methodologies were evaluated HCl 0.1 M, HCl: MeOH 0.1 N (1: 1), MeOH: H₂O (15:85 v / v), and Phosphate Buffer pH 5.8 by UV spectrophotometry. The results show that the 0.1N HCl: MeOH (1: 1) dissolution medium does not meet the parameters to be considered as an adequate methodology to quantify acetaminophen. The dissolution HCl 0.1M, MeOH: H₂O (15:85 v / v), and Phosphate Buffer pH 5.8 are precise (in terms of repeatability and reproducibility), exact and selective (% CV≤3), being within the criterion of acceptance of marking in the standard.

Due to the results, we can conclude that the analytical method present good suitability and are stable, the proportionality test is not significantly different from zero, and there is no proportionality between the concentration and the absorbance of the method. Thus, achieving the implementation of a chemical validation method by ultraviolet spectrophotometry that allowed the quantification of acetaminophen.

References

1. Hendrickson R. Acetaminophen: In Hoffman R.S., Howland M., Lewin N.A., Nelson L.R., Goldfrank L.R. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 9a ed. Estados Unidos: McGrawHill, 2015.
2. Fernández AD, Fernández AD, Mancipe L. Intoxicación por Acetaminofén. *Colomb. Med.* 2010; 18(2): 221-227. Doi:10.18359/rmed.1314
3. Domínguez PD, Pérez RM, Reséndiz RJ. Los medicamentos genéricos intercambiables: su origen e impacto en México durante el periodo de 1998-2005. *Mundo Siglo XXI.* 2008; 11: 91-99.
4. FEUM. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Apéndice III. Validación de métodos analíticos. 11ª ed., Vol. I. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. CDMX, 2014. p 2787-2795.
5. DOF. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. *Diario Oficial de la Federación*, 1-71. 2016 [acceso 30 mayo de 2021]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424575&fecha=05/02/2016.
6. DOF. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. 2013 [acceso 20 de Abril de 2021]. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013
7. Ortega GM, Rodríguez MC, Zhurbenko R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2010; 48(2): 162-176.
8. Castillo AB, González HR. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev. Cuba. de Farm.* 1997; 30(1), 1-9.
9. DOF. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. *Diario Oficial de la Federación*, 1-71. 2016 [acceso 20 de abril de 2021]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424575&fecha=05/02/2016.
10. OPS. Validación de Métodos Analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico Anexo I informe 36. Organización Panamericana de la Salud, 1-45. 2002 [acceso 19 octubre de 2021]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe_36_Anexo_3.pdf
11. Ocaña-Sánchez MF, López-Canul MG, Castro-Gerónimo VD, Hernández- Lozano M. Importancia de la validación y verificación de los métodos analíticos para determinación de TGO, TGP, proteínas totales y albúmina por método espectrofotométrico semiautomatizado en un laboratorio de investigación farmacológica preclínica. *Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Celaya*, 2014. P. 3356-3361.
12. Vargas AY, López MA, Poot LLF. (s.f.). *Importancia de la validación en la Industria Farmacéutica*. Obtenido de PHARMA NEWS: <http://www.revistapharmanews.com.mx/?q=content/importancia-de-la-validacion-en-la-industria-farmac%C3%A9utica>.
13. FEUM. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. MGA 0361. Espectrofotometría visible y ultravioleta. 11ª ed., Vol. I. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. CDMX, 2014. p 357-361.
14. FEUM. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Generalidades: Limpieza de material de vidrio. 11ª ed., Vol. I. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. CDMX, 2014. p 11
15. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos. *Diario Ofi-*

cial de la Federación, Primera sección, 1-75. 2013 [acceso 20 de abril de 2021]. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013

16. ICH (Harmonised Tripartite Guideline): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. 1995;1-17.

17. Quattrocchi OA, De Andrizzi SA, Laba RF. *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro SA, 1992. p 241-266.

18. Camacho M, Torres A, Gil M, Obregón M, Ruz V. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *ATP Pharma Practique*. 1993; (3), 197-202.

19. FEUM. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Monografía Paracetamol*. 11ª ed., Vol. II. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. CDMX, 2014. p 2188-2189.

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i2.22348

Originales Breves

Use of Tocilizumab in hospitalized patients during the first wave of the COVID-19 pandemic

Uso de tocilizumab en pacientes hospitalizados durante la primera ola de la pandemia COVID-19

Francisco Javier Carrera-Hueso¹  0000-0002-4459-6059

Laura Álvarez-Arroyo^{1,2}  0000-0002-3745-4263

Montse Robustillo-Villarino³  0000-0001-5193-2500

Óscar Pérez-Olaso⁴

David El-Qutob⁵  0000-0003-4837-782X

Fernando Martínez-Martínez⁶  0000-0001-8247-1751

¹Hospital Universitario La Plana, Servicio de Farmacia, Vila- Real, España

²Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Programa de Doctorado, Granada, España.

³Hospital Universitario La Plana, Sección de Reumatología, Vila- Real, España

⁴Hospital Universitario La Plana, Servicio de Microbiología, Vila- Real, España

⁵Hospital Universitario La Plana, Sección de Alergología, Vila- Real, España

⁶Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Grupo de Investigación Atención Farmacéutica, Granada, España.

Correspondencia

Laura Álvarez Arroyo
lauraalvarez6@yahoo.es

Recibido: 29.09.2021

Aceptado: 25.01.2022

Publicado: 21.04.2022

Agradecimientos

This article is part of the doctoral thesis carried out by Laura Álvarez Arroyo, in the PhD program in Pharmacy of the University of Granada.

Financiación

This study has not support from either Public or Private Institution

Conflicto de intereses

All authors have nothing to declare.

Resumen

Introducción: El objetivo del estudio fue estudiar la utilización de tocilizumab en un centro hospitalario

Método: Estudio de cohortes retrospectivo que incluyó pacientes ingresados adultos infectados por SARS-CoV-2, con una infección de gravedad moderada ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$). Se calcularon las OR de mortalidad y éxito del tratamiento.

Resultados: El grupo tocilizumab ($n=18$), tuvo 5 vs 7 días con síntomas en el grupo no tratado ($n=71$). El $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ mínimo fue de 147,5 (IC95%: 116,7 a 194,0) versus 255,6 (IC95%: 320,7 a 452,4) ($p=0,01$).

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en supervivencia (OR=1,22; IC95%: 0,38 a 3,92); ni en el éxito del tratamiento (OR=0,46; IC95%: 0,16 a 1,33). Tras ajustar por edad, sexo y dosis total de corticoide, OR de éxitos fue 0,18 (IC95%: 0,03 a 0,96), mientras que mortalidad no fue significativa.

Conclusiones: El uso de tocilizumab en pacientes hospitalizados moderadamente graves podría disminuir su estado hiperinflamatorio.

Palabras clave: Tocilizumab; COVID-19; estudio de cohortes

Abstract

Introduction: The aim of this study was to characterize the use of tocilizumab in a hospital.

Method: Retrospective cohort study including adult SARS-CoV-2 infected inpatients with moderately severe infection ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$). ORs for mortality and treatment success were calculated.

Results: The tocilizumab group ($n=18$), presented 5 days of symptoms vs 7 days in the untreated group ($n=71$). Minimum $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ was 147.5 (95%CI: 116.7 to 194.0) vs 255.6 (95%CI: 320.7 to 452.4) ($p=0.01$).

No significant differences were found between the two groups concerning survival (OR=1.22; 95%CI: 0.38 to 3.92), nor treatment success (OR=0.46; 95%CI: 0.16 to 1.33). After adjusting for age, sex and total corticosteroid dose, OR for success was 0.18 (95%CI: 0.03 to 0.96), while mortality was not significant.

Conclusions: The use of tocilizumab in moderately severe hospitalized patients could decrease the hyperinflammatory state preventing disease progression.

Keywords: Tocilizumab; COVID-19; cohort study.

Puntos clave

A pesar de que llevamos casi más de un año de pandemia, continuamos sin tratamientos eficaces para el tratamiento del coronavirus, con la excepción de los corticoides y algunos trabajos recientemente publicados de tocilizumab.

Es por este motivo que parece fundamental la investigación y publicación de los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos empleados.

Introducción

SARS-CoV-2 coronavirus infection could be manifested in most patients asymptotically or with mild symptoms (fever, dry cough, myalgia, headache, diarrhea, anosmia, among others). Other patients develop a severe lower respiratory tract infection, with significant dyspnea requiring oxygen therapy, which can progress into a life-threatening acute respiratory distress syndrome⁽¹⁾.

Tocilizumab is a monoclonal antibody that binds to the interleukin 6 (IL6) receptor, and it is used in rheumatoid arthritis⁽²⁾. It has been used off-label, in the absence of specific treatments, in SARS-CoV-2 coronavirus infection, to block the action of IL6, and to decrease the hyperinflammatory response in severe patients.

In this article we present the use of tocilizumab in a Spanish hospital during the first wave of the COVID-19 pandemic.

Métodos

Retrospective cohort study conducted in a 258-bed hospital, 12 of which were Intensive Care Unit (ICU) beds; from February 26 to May 20, 2020.

All SARS-CoV-2 infected subjects diagnosed by a positive RT-PCR test of nasopharyngeal swab or sputum, admitted to the hospital during the study period were included. Those under 18 years of age, pregnant or breastfeeding women were excluded. Data from readmitted patients were also excluded from the analysis. The clinical characteristics of the study sample have been published recently⁽³⁾. Subsequently, we selected tocilizumab-treated subjects with moderately severe infection (PaO₂/FiO₂ [PAFI] < 300). Patients treated with other anti-inflammatory drugs such as anakinra and/or baricitinib were excluded.

The primary endpoint was mortality rate, while the secondary endpoint was treatment success, considering as the opposite of failure defined as death or ICU admission (PAFI < 200).

Demographic data, comorbidities, clinical symptoms prior to admission, laboratory test and radiological results, as well as treatments during hospital admission were obtained. The patients included in the study gave their consent to receive treatment according to the local protocol, and the study was approved by the corresponding IRB on May 25, 2020. Adverse effects related to tocilizumab were also recorded.

Qualitative variables were described as frequencies and percentages, and analyzed by Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate. Quantitative variables were described as means or medians and interquartile range (IQR); and analyzed parametrically or non-parametrically, according to their normal distribution. The impact measures used were the Odds Ratio (OR) for outcome, death and success, and were obtained adjusted for age, sex and corticosteroid dose by logistic regression. For laboratory parameters before and after drug administration, Student's t-test for paired samples was used. All tests were considered significant with an alpha of 0.05; and the IBM SPSS statistical package was used (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Resultados

Patients treated with one or more anti-inflammatory drugs (four with baricitinib; 26 with anakinra were 11.4% of the 255 patients infected with SARS-CoV-2). Of the remaining 226, 18 subjects received tocilizumab, and 39.4% (n=89) had a PAFI<300. The main characteristics of the sample are described in Table 1.

Table 1. Characteristics of patients with PaO₂/FIO₂ < 300 at hospital admission.

N (%)	NT Group (n= 71)	T Group (n= 18)	p
Age in years, median (IQR)	78,1 (68,1-84,6)	67,2 (59,0-75,4)	0,01
Sex			
Female	32 (45,1)	8 (44,4)	0,96
Male	39 (54,9)	10 (55,6)	
Hypertension	45 (63,4)	8 (44,4)	0,14
Diabetes	27 (38,0)	3 (16,7)	0,10
Ischemic heart disease	8 (11,3)	1 (5,6)	0,68
Chronic kidney disease	21 (29,6)	2 (11,1)	0,14
Chronic obstructive pulmonary disease	4 (5,6)	3 (16,7)	0,14
Asthma	5 (7,0)	3 (16,7)	0,20
Other chronic pulmonary diseases	9 (12,7)	2 (11,1)	1,00
Heart failure	6 (8,5)	1 (5,6)	1,00
Cirrhosis	1 (1,4)	1 (5,6)	0,37
Cancer	11 (15,5)	2 (11,1)	1,00
Cardiovascular disease	20 (28,2)	3 (16,7)	0,38
Cerebrovascular disease	6 (8,5)	0 (0,0)	0,34
Dyslipidemia	35 (49,3)	7 (38,9)	0,43
Smoker	8 (11,3)	1 (5,6)	0,68
Obesity (BMI≥30 Kg/m ²)	16 (22,5)	5 (27,8)	0,64
HIV	1 (1,4)	0 (0,0)	1,00
Inflammatory bowel disease	0 (0,0)	0 (0,0)	--
Autoimmune diseases	4 (5,6)	2 (11,1)	0,60
Dementia	11 (15,5)	0 (0,0)	0,11
Pulmonary embolism or deep vein thrombosis	1 (1,4)	0 (0,0)	1,00
Rheumatoid arthritis	4 (5,6)	1 (5,6)	1,00
Treatment			
Anticoagulant	15 (21,1)	0 (0,0)	0,04
NSAIDs	4 (5,6)	1 (5,6)	1,00
ACE inhibitors or ARBs	34 (47,9)	6 (33,3)	0,27
Symptoms			
Fever	53 (74,6)	16 (88,9)	0,20
Dyspnea	35 (49,3)	10 (55,6)	0,64
Dry Cough	36 (50,7)	15 (83,3)	0,02
Expectoration	9 (12,7)	5 (27,8)	0,12
Sore throat	2 (2,8)	0(0,0)	1,00
Myalgia	10 (14,1)	4 (22,2)	0,47
Headache	5 (7,0)	2 (11,1)	0,63
Dizziness	2 (2,8)	2 (11,1)	0,18
Diarrhea	14 (19,7)	5 (27,8)	0,46

N (%)	NT Group (n= 71)	T Group (n= 18)	p
General malaise	37 (52,1)	8 (44,4)	0,56
Anosmia	2 (2,8)	0 (0,0)	1,00
Ageusia	2 (2,8)	0 (0,0)	1,00
Chest pain	2 (2,8)	1 (5,6)	0,50
Days with symptoms, median (IQR)	7,0 (3,0-8,0)	5,5 (2,5-7,0)	0,37

IQR: interquartile range. T group: tocilizumab-treated group. NT group: group not treated with tocilizumab.

No differences were found in the radiological pattern between the tocilizumab-treated group (T group) versus the (NT group) ($p=0.82$).

The T group presented fewer days with symptoms (5 days vs 7 days) and received a mean dose of 666.7 mg ($SD=72.31$). The T group had also a significantly lower ($p=0.01$) minimum PAFI during hospitalization, with a median of 147.5 (95%CI: 116.7 to 194.0) versus 255.6 (95%CI: 320.7 to 452.4) in the NT group. The T group received on average 90.4 ($SD=20.8$) mg of methylprednisolone and the NT group 58.9 ($SD= 9.48$) mg on average. The median duration of corticosteroid therapy was 7 days (95%CI: 3 to 11 days) and 3 days (95%CI: 3 to 6 days) for T and NT group, respectively.

In the T group died 5 patients (27.8%), and 17 (23.9%) in the NT group without significant differences between the two groups ($p=0.74$). The OR was 1.22 (95%CI: 0.38 to 3.92). No differences were also observed ($p=0.15$) in terms of treatment success ($n=10$; 55.6%) or not success ($n=52$; 73.2%) in the T group, with an OR=0.46 (95%CI: 0.16 to 1.33). Figure 1 shows the crude ORs, and adjusted ORs for age, sex and total corticosteroid dose of the final results. After adjustment, the OR of successes obtained becomes significant ($p=0.05$), being 0.18 (95%CI: 0.03 to 0.96), while it is still not significant in mortality.

Table 2 shows the laboratory results before and after tocilizumab administration, significantly affecting C-reactive protein values ($p=0.04$). In T group the most frequent adverse effects were moderate neutropenia (500-1000 neutrophils/ μ L) in 3 patients (16.6%), and increased transaminases (3 times the upper normal limit) in 4 patients (22.2%).

Table 2. Evolution of inflammatory analytical parameters before and after tocilizumab administration.

Laboratory test, median (IQR)	Tocilizumab (N=18)		P
	Before	After	
Leukocytes, absolute count $\times 10^9/L$	6,3 (3,9-7,9)	7,7 (3,7-11,9)	0,30
Lymphocytes, count \times /L	0,6 (0,5-1,2)	1,2 (0,7-1,4)	0,15
C-reactive protein, mg/dL	11,30 (5,29-18,03)	1,74 (0,26-7,51)	0,04
Lactate dehydrogenase, U/L	369,0 (258,0-382,5)	461,0 (222,0-531,5)	0,47
D-dimer mg/mL	883,0 (780,5-2147,5)	1246,5 (534,0-2931,0)	0,31
Ferritin, ng/mL	963,8 (741,5-2001,4)	1265,3 (859,0-2198,4)	0,13
Procalcitonin ng/mL	0,140 (0,110-0,199)	0,121 (0,049-0,242)	0,35
Aspartate aminotransferase (AAT), U/L	63,1 (44,6-109,2)	63,1 (44,6-70,3)	0,37
Alanine aminotransferase (ALT), U/L	29,5 (16,4-37,9)	38,2 (21,3-71,2)	0,17
Troponin T-hs, pg/mL	11,98 (8,87-18,01)	9,73 (8,50-21,87)	0,32
PaO ₂ /FiO ₂	306,7 (240,7-337,5)	356,5 (156,8-445,2)	0,78

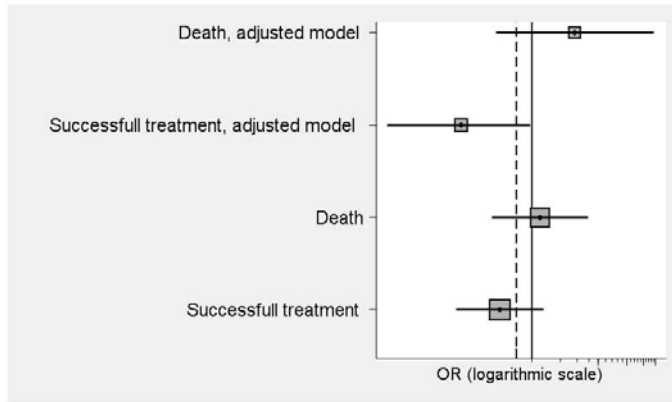


Figure 1. Outcomes of treatment with or without tocilizumab (odds ratio): death and success*.

*OR adjusted for sex, age and corticosteroid dose.

Discusión

In our cohort of patients with moderately severe SARS-CoV-2 infection, tocilizumab administration did not produce improvement in neither mortality nor in health care success. Perhaps, it could improve mortality as showed in Figure 1, but due to the small cohort size this is inconclusive.

These results are in concordance with other studies where tocilizumab showed no significant improvement in mortality rates^(4,5). However, other results suggested that tocilizumab could enhance survival⁽⁶⁻⁸⁾.

These differences could be due to the studies design or the moment in the pandemic in which they were conducted. In a recent published meta-analysis, the authors found significant differences according to the study design⁽⁹⁾

Our low sample size is due to drug supply problems, and to the restrictions imposed by the Ministry of Health⁽¹⁰⁾. During the first COVID-19 pandemic wave, tocilizumab treatments were administered to the most critical patients, and to those who were not responding to corticosteroids and high oxygen flow treatment.

Subjects in the T group were significantly younger than those in the NT group, showing a possible selection bias. A non-significant improvement in respiratory status with higher PAFI (see Table 2) after tocilizumab administration, such as in previous studies, was observed⁽⁴⁾

Tocilizumab produced improvement in the hyperinflammatory state, reducing C-reactive protein by 84.6% after administration, a similar result to that obtained by Albertini et al⁽¹¹⁾. No differences were found in D-dimer and ferritin as observed by other authors.^(8,12,13)

Tocilizumab was well-tolerated, and, from a safety point of view, the adverse effects observed (neutropenia and hepatotoxicity) were transient. Similar results were obtained by Duarte *et al*⁽⁷⁾ in a cohort of elderly patients in our country.

Dexamethasone has been shown to be lifesaving treatment for moderate COVID-19 infections⁽¹⁴⁾. The results of the RECOVERY study⁽¹²⁾ have recently been published showing a benefit in mortality after adding tocilizumab to corticosteroids, improving the absolute risk difference by 4%. Its marginal benefit or whether it is due exclusively to the corticosteroid is not entirely clear. In our study, we considered it a confounding factor, and therefore, we performed an adjusted analysis, as well as by sex and age, without significant results.

This work presents the limitations of retrospective observational studies (selection bias and confounding factors). Consequently, our results should be taken with caution, and should be confirmed in randomized clinical trials.

In conclusion, although we did not detect significant differences in survival, the use of tocilizumab in moderately severe hospitalized COVID-19 infected patients could reduce or alleviate the hyperinflammatory state, preventing disease progression and admission to the ICU.

Bibliografía

1. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2020 ;39(5):405-7
2. Shetty A, Hanson R, Korsten P, Shawagfeh M, Arami S, Volkov S, et al. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond. *Drug design, development and therapy*. 2014;8:349-64.
3. Alvarez-Arroyo L, Carrera-Hueso FJ, El-Qutob D, Robustillo-Villarino M, Girona-Sanz AM, Pin-Godos MT. Estudio descriptivo de una cohorte de pacientes COVID 19 hospitalizados en España. *Gac Med Mex*. 2021;157(1):76-83
4. Melegari G, Giuliani E, Dallai C, Veronesi L, Bertellini E, Osmenaj S, Barbieri A. Intensive Care Patients from the First COVID-19 Wave: One-Year Survival after Tocilizumab Treatment. *J Pers Med*. 2021;11(11):1234. doi: 10.3390/jpm11111234.
5. Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med*. 2021;384(16):1503-1516.
6. The REMAP-CAP investigators, interleukin-6 receptor antagonist in critically ill patients with covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:1491-1502.
7. Duarte-Millán MA, Mesa-Plaza N, Guerrero-Santillán M, Morales-Ortega A, Bernal-Bello D, Farfán-Sedano AI et al. Prognostic factors and combined use of tocilizumab and corticosteroids in a Spanish cohort of elderly COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2021 Nov 29. doi: 10.1002/jmv.27488.
8. Mushtaq MZ, Mahmood SBZ, Almas A, Ather Wasti S, Ahsan Ali S. Tocilizumab in critically ill COVID-19 patients: An observational study. *Int Immunopharmacol*. 2021 Nov 20:108384. doi: 10.1016/j.inimp.2021.108384.
9. Luo L, Luo T, Du M, Mei H, Hu Y. Efficacy and safety of tocilizumab in hospitalized COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2021:S0163-4453(21)00557-0.
10. Ortiz Pérez S, Caro Teller JM, García Muñoz C, Herraiz Robles P, Lozano Morillo F, Pablos Álvarez JL, Ferrari Piquero JM. Suministro controlado de tocilizumab durante la pandemia de COVID-19 e influenza sobre el tratamiento de pacientes reumatológicos. *Rev Esp Salud Publica*. 2021;95:e202111109.
11. Albertini L, Soletchnik M, Razurel A, Cohen J, Bidegain F, Fauvelle F, et al. Observational study on off-label use of tocilizumab in patients with severe COVID-19. *Eur J Hosp Pharm*. 2021;28(1):22-7.
12. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): preliminary results of a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2021;397(10285):1637-1645.
13. Levi M. Tocilizumab in severe COVID-19: A promise fulfilled. *Eur J Intern Med*. 2021 Nov 22:S0953-6205(21)00390-3. doi: 10.1016/j.ejim.2021.11.015.
14. Águas R, Mahdi A, Shretta R, Horby P, Landray M, White L, et al. Potential health and economic impacts of dexamethasone treatment for patients with COVID-19. *Nat Commun*. 2021;12(1):915

doi: 10.30827/ars.v63i2.23505

Notas Clínicas

Dolor lumbar persistente tras la administración de [¹³¹I]Iodo-6-β-iodometil-19-norcolesterol: a propósito de un caso

Lower back pain after iodine-131-6-β-iodomethyl-19-norcholesterol injection: a case report

Jaime Andrés Bonilla-Plaza¹  0000-0001-9856-571X

María Hilda García-Ruiz²  0000-0001-8203-771X

Laura Baz-Sanz²  0000-0003-1459-0462

Paz Azpeitia-Hernández¹  0000-0002-7391-1468

Rosa María Castro-Velasco¹  0000-0003-3576-0854

Juan Antonio Pérez-Iruela²  0000-0002-1277-8587

¹Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España.

²Servicio de Radiofarmacia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España.

Correspondencia

Juan Antonio Pérez-Iruela

juanantonio.perez@salud.madrid.org

Recibido: 16.12.2021

Aceptado: 06.02.2022

Publicado: 21.04.2022

Financiación

No tiene financiación ninguna.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen conflicto de intereses.

Resumen

El [¹³¹I]Iodo-6-β-iodometil-19-norcolesterol ([¹³¹I]Norcolesterol), radiofármaco indicado en el diagnóstico del estado funcional de tejido cortical suprarrenal, en la detección del tejido funcional en el hiperadrenocorticalismo así como en el aldosteronismo primario. Presentamos el caso de una mujer de 54 años de edad, remitida para la evaluación de una sospecha de aldosteronismo, y que inmediatamente después de la administración intravenosa de [¹³¹I]Norcolesterol sufrió una fuerte reacción adversa al medicamento, con mareo, rubor, aumento de la presión arterial, opresión en el pecho, dolor lumbar y sarpullido eritematoso hasta 9 días postinyección. Los síntomas se resolvieron satisfactoriamente tras la administración de antihistamínicos y corticoides. Se sospechó que esta reacción estuviera relacionada con la administración del [¹³¹I]Norcolesterol causada por una reacción alérgica de tipo I.

Palabras clave: NP-59; reacción adversa; farmacovigilancia.

Abstract

The [¹³¹I]Iodine-6-β-iodomethyl-19-norcholesterol ([¹³¹I]Norcholesterol; NP-59), is indicated in the diagnosis of the functional state of adrenal cortical tissue, in the detection of functional tissue in hyperadrenocorticalism as well as in primary aldosteronism. We present the case of a 54-year-old woman, referred for evaluation of suspected aldosteronism, and who immediately after intravenous administration of [¹³¹I]Norcholesterol suffered a strong adverse drug reaction, with dizziness, flushing, increased blood pressure, chest tightness, low back pain and erythematous rash up to 9 days after injection. Symptoms resolved satisfactorily after administration of antihistamines and corticosteroids. This reaction was suspected to be related to the administration of [¹³¹I]Norcholesterol caused by a type I allergic reaction.

Keywords: NP-59; adverse drug reaction; pharmacovigilance.

Puntos clave

Debido a la escasa incidencia de las reacciones adversas a radiofármacos, dar a conocer este tipo de comunicaciones es fundamental para poner en conocimiento de los profesionales relacionados con estos medicamentos, las posibles complicaciones y las precauciones a considerar en su administración.

Hay que considerar también que, los radiofármacos se administran en magnitudes inferiores al microgramo, por tanto, el desarrollo clínico transcurrido en la reacción adversa, así como la duración del episodio de hasta 9 días, es de relevancia desde el punto de vista clínico, de la farmacovigilancia con radiofármacos, y es interesante tener en cuenta el desarrollo de estas reacciones en el manejo de los pacientes que asisten a los servicios de medicina nuclear y a los que se les debe administrar radiofármacos.

Introducción

Las reacciones adversas (RA) a radiofármacos son extremadamente raras, pudiendo tener una incidencia en Europa entre 2,1 y 11 por 100.000 administraciones de radiofármacos^(1,2).

El [¹³¹I]Norcolecosterol es un análogo del colesterol⁽³⁾ que se concentra en los tejidos como la corteza adrenal donde se sintetizan hormonas esteroideas. Se emplea como radiofármaco en el diagnóstico del estado funcional del tejido adrenal, permitiendo su localización gammagráfica en el síndrome de Cushing, en el aldosteronismo y en el hiperadrenocorticalismo⁽³⁾.

Descripción del caso

Paciente mujer de 54 años con antecedentes de hipertensión descubierta en un chequeo físico rutinario, mostrando una presión arterial sistólica de 160 mm de Hg y un nivel de noradrenalina plasmática ligeramente elevado (497 pg/ml, valores normales: 100-450 pg/ml). Otros signos vitales y resultados de laboratorio se encontraban dentro de los límites normales. No tenía antecedentes de reacciones alérgicas. Se le deriva al Servicio de Medicina Nuclear para la realización de una gammagrafía de cápsulas adrenales, para lo que se le administró intravenosamente una dosis de 37 MBq de [¹³¹I]Norcolecosterol (CIS Bio International) y así evaluar un posible aldosteronismo primario.

Previo a la inyección del radiofármaco se prescribió 1 mg de dexametasona 4 veces al día durante los 7 días previos a la prueba y continuando durante el periodo de obtención de imágenes⁽⁴⁾ para lograr la supresión de secreción de ACTH hipofisaria, y favoreciendo la captación de [¹³¹I]Norcolecosterol en la zona glomerulosa, mientras se inhibe la captación del radiofármaco en la zona fasciculata-reticularis dependiente de ACTH.

Tan pronto cómo se inició la infusión del radiofármaco, la paciente desarrolló rubor, opresión en el pecho, aumento de la presión arterial (160/90 mm Hg) e intenso dolor de espalda principalmente a nivel renal. Se remitió a la paciente al Servicio de Urgencias.

Se le administraron dexametasona, ranitidina y dexclorferinamina por vía intravenosa. Se observó alivio del enrojecimiento y del malestar en el pecho, pero no disminuyó el dolor de espalda.

El examen clínico no reveló hallazgos significativos. Los glóbulos blancos, el hematocrito y la bioquímica sanguínea fueron normales, así como la radiografía de tórax y el ECG realizados. La paciente mostró una mejoría clínica, salvo por el dolor de espalda que persistió, aunque con menor severidad. Permaneció en el Servicio de Urgencias durante unas horas y finalmente fue dada de alta en buen estado clínico.

Después de 9 días, notó un sarpullido con leve picor a nivel torácico, por lo que regresó al Servicio de Urgencias con pocos o ningún cambio en el examen físico, donde se le prescribieron antihistamínicos y se derivó a la consulta de Alergología.

Discusión

Se trata de un radiofármaco que con frecuencia puede producir reacciones adversas (RA)^(3,5,6). Hay descritos casos como el publicado por Kazerooni y col⁽³⁾, en una mujer de 21 años con una historia de RA a múltiples procedimientos que experimentó una reacción que requirió tratamiento. La paciente desarrolló náusea y mareo al finalizar la administración en perfusión de 74 MBq de [¹³¹I]Norcolessterol. Esto fue acompañado de rubor, cefalea, dificultad respiratoria, dolor torácico y de espalda, y una pérdida de conciencia durante 10-20 segundos, taquicardia e hipertensión (150/110 mm Hg). Tras recibir difenhidramina vía oral, sus síntomas fueron desapareciendo a lo largo de 1 hora y sus signos vitales se estabilizaron. En nuestro caso, la sintomatología fue muy parecida a la descrita por estos autores, aunque la paciente estuvo consciente en todo momento, y hasta su completa estabilización transcurrieron 3-4 horas ingresada en el Servicio de Urgencias.

Spyridonidis y col⁽⁶⁾ hicieron público un estudio de la eficacia del [¹³¹I]Norcolessterol. En él desarrollaron dos casos de RA ocurridas con [¹³¹I]Norcolessterol. En ambos casos con episodios muy parecidos de rubor, opresión en el pecho, aumento de la presión arterial (160/90 mm Hg) y un intenso dolor en la zona lumbar a la altura de los riñones. Aunque en uno de los casos, los síntomas no fueron tan graves ni requirió el traslado al Servicio de Urgencias del Hospital. Tras la administración de antihistamínicos y corticoides remitieron todos los síntomas menos el dolor lumbar. En nuestro caso, son característicos dos hechos, el primero corresponde a la duración del dolor lumbar durante varios días, según describió la paciente. El otro, es la aparición de un sarpullido generalizado con picor a nivel torácico después de 9 días de la inyección del radiofármaco, sin tomar ninguna otra medicación durante ese tiempo, y que le hizo volver al Servicio de Urgencias del Hospital donde se le administraron antihistamínicos.

La opresión en el pecho, el dolor en la zona lumbar, el rubor y el sarpullido, fueron comunicadas a través del Sistema Español de Farmacovigilancia como características de esta notificación, y así está descrita en la ficha técnica del medicamento⁽⁴⁾. También se atribuyen al [¹³¹I]Norcolessterol otros síntomas más inespecíficos como náusea, vómito, eritema, reacción respiratoria, disnea, taquicardia, mareo, cefalea, diaforesis, sudor facial, dolor abdominal y disgeusia⁽⁴⁾.

Entre los años 1997 a 2000 se han recogido por parte del Sistema Europeo de Notificación de Reacciones Adversas a radiofármacos publicado por Hesslewood y col⁽¹⁾, ocho notificaciones de RA atribuibles al [¹³¹I]Norcolessterol, cuya sintomatología ha sido descrita como: opresión en el pecho y molestia durante la inyección no atribuible a la aguja, siendo el dolor en la zona lumbar una característica de todos estos informes. La Japan Radioisotope Association informó en su resumen periódico⁽⁷⁾ que, durante el periodo de 1978-1993 se produjeron un total de 111 RA con este medicamento.

La comunicación de RA a radiofármacos es fundamental para dar a conocer a los profesionales implicados en la preparación, dispensación y administración de radiofármacos, las complicaciones que pueden ocurrir con este tipo de medicamentos.

Bibliografía

1. Hesslewood SR, Keeling DH. Frequency of adverse reactions to radiopharmaceuticals in Europe. *Eur J Nucl Med*. 1997;24:1179-82. DOI: 10.1007/BF01254254
2. Silberstein EB, Ryan J. Prevalence of adverse reactions in nuclear medicine. Pharmacopeia Committee of the Society of Nuclear Medicine. *J Nucl Med*. 1996;37:185-92.
3. Kazerooni EA, Sisson JC, Shapiro B, Gross MD, Driedger A, Hurwitz GA, Mattar AG, Petry NA. Diagnostic accuracy and pitfalls of [iodine-131]6-beta-iodomethyl-19-norcholesterol (NP-59) imaging. *J Nucl Med*. 1990; 31: 526-534.
4. Ficha Técnica norcolessterol iodado (¹³¹I). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Centro de Información de Medicamentos (CIMA)
5. https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/71492/FichaTecnica_71492.html (última visualización 30 de enero de 2022)

6. Maltby PJ, Smith ML. An adverse reaction to [131]iodomethylnorcholesterol. *Nucl Med Commun.* 2002; 23:505–506. DOI: 10.1097/00006231-200205000-00014
7. Spyridonidis T, Giannakenas C, Lakiotis V, Apostolopoulos DJ. Adverse reactions following NP-59 administration. *Nucl Med Commun.* 2008;29(8):749–750. DOI: 10.1097/MNM.0b013e328301834c
8. Subcommittee of Safety Issue for the Radiopharmaceuticals, Medical and Pharmaceutical Committee, Japan Radioisotope Association. The twenty-second report on survey of the adverse reaction to radiopharmaceuticals (the 25th survey in 1999). *Kaku Igaku.* 2001; 38: 139-50.

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i2.21894

Artículos de revisión

***Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. en el tratamiento de los síntomas vasomotores de la menopausia: revisión**

Cimicifuga racemosa (L.) Nutt. in the treatment of vasomotor symptoms of menopause: a review

Hilaria M. García-Bienes¹  0000-0002-9607-9854

Candelaria C. Sánchez-Mateo¹  0000-0002-4425-5553

¹Universidad de La Laguna, Facultad de Farmacia, Departamento de Medicina Física y Farmacología, La Laguna (Tenerife), España.

Correspondencia

Candelaria C. Sánchez-Mateo.
csanchez@ull.edu.es

Recibido: 28.07.2021

Aceptado: 21.11.2022

Publicado: 21.04.2022

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

Ningún conflicto de interés.

Resumen

Introducción: Diversos estudios han puesto de manifiesto que los preparados a base de los rizomas y raíces de cimicífuga (*Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.) pueden ser útiles para aliviar los síntomas menopáusicos. El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la eficacia y seguridad de estos preparados en el tratamiento de los síntomas vasomotores de la menopausia.

Método: Se realizó una búsqueda de los artículos publicados desde enero de 2005 a marzo de 2021 en el buscador de recursos de la Universidad de La Laguna, “el Punto Q”. Se seleccionaron los ensayos clínicos aleatorizados y controlados, que tuvieran las palabras claves en el resumen, texto o título, tanto en inglés como en español.

Resultados: Se identificaron 13 ensayos clínicos que incluían los criterios de selección establecidos. Se encontró que los preparados de cimicífuga (principalmente extractos comerciales estandarizados en su contenido en principios activos) produjeron en la mayoría de los estudios una reducción significativa comparada con el placebo de los síntomas vegetativos (sofocos y sudores nocturnos) y psicológicos de la menopausia, así como una mejoría de la calidad de vida. No se observaron efectos adversos serios a las dosis utilizadas.

Conclusiones: Los extractos de cimicífuga pueden ser eficaces y seguros para el tratamiento de los síntomas vegetativos y psicológicos de la menopausia, siendo bien tolerados. No obstante, son necesarios más ensayos clínicos con mayor número de pacientes, más extensos, uso de preparaciones estandarizadas, así como con criterios similares de inclusión y valoración de los síntomas, para obtener datos más concluyentes.

Palabras clave: *Cimicifuga racemosa*; menopausia; sofocos; síntomas vasomotores; revisión.

Abstract

Introduction: Several studies have shown that preparations based on the rhizomes and roots of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.) can be useful in alleviating the menopausal symptoms. The aim of this study is to perform an update bibliographic review of the efficacy and safety of black cohosh in the treatment of the vasomotor symptoms of menopause.

Method: A review of published articles from January 2005 to March 2021 in the resource search engine of the University of La Laguna, el punto Q”. Randomized and controlled clinical trials, which had the key words in the abstract, text or title, in both English and Spanish, were selected.

Results: We found 13 trials which met the selection criteria. The studies reviewed showed that the black cohosh preparations (mainly commercial extracts standardized in their content of active ingredients) produced in most of the studies a significant reduction compared to placebo in the vegetative (hot flashes and night sweats) and psychological symptoms of menopause, as well as an improvement in the quality of life. No serious adverse effects were reported at the dose administered.

Conclusions: *Cimicifuga racemosa* extracts can be effective and safe for the treatment of vegetative and psychological symptoms of menopause, being well tolerated. However, more clinical trials with a larger number of patients, more extensive, the use of standardized preparations, as well as similar criteria for inclusion and assessment of symptoms, are necessary to obtain more conclusive data.

Keywords: *Cimicifuga racemosa*; menopause; hot flushes; vasomotor symptoms; review.

Puntos clave

Los rizomas y raíces de *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. se han usado tradicionalmente para el tratamiento de diferentes desórdenes ginecológicos. En los últimos años, varios ensayos clínicos han demostrado la eficacia de los preparados a base de cimicífuga en el tratamiento de los síntomas menopáusicos, aunque algunos estudios han mostrado resultados contradictorios.

En este trabajo se propone realizar una revisión crítica de las evidencias disponibles hasta el momento acerca de la eficacia y seguridad de estos preparados en la menopausia, en particular en los síntomas vasomotores.

Se pretende esclarecer si la cimicífuga es una alternativa eficaz y segura para el alivio de los síntomas menopáusicos y contribuir así a su uso adecuado basado en la evidencia científica.

Introducción

La menopausia se define como el cese permanente de la menstruación por pérdida de la actividad folicular ovárica, determinado de manera retrospectiva, después de doce meses consecutivos de amenorrea, sin causas patológicas, que suele sobrevenir alrededor de los 50 años^(1,2). La privación estrogénica provoca una serie de cambios fisiológicos y psicológicos, que pueden afectar significativamente la salud y calidad de vida de las mujeres. Entre los principales síntomas asociados a esta etapa podemos destacar los trastornos vasomotores (bochornos, sudoración nocturna), psicoafectivos (cambios de humor, insomnio, fatiga) o urogenitales (sequedad vaginal, atrofia urogenital)^(1,2).

Uno de los tratamientos utilizados para tratar estos síntomas es la terapia hormonal sustitutiva (THS), que consiste en la administración de estrógenos solos o combinados con progestágenos. Sin embargo, esta terapia está recomendada solo para mujeres sintomáticas, a la mínima dosis eficaz y durante el menor tiempo posible, ya que presenta más riesgos que beneficios a largo plazo (incremento de riesgo de cáncer de endometrio, infarto de miocardio o tromboembolismo venoso)⁽¹⁾.

En los últimos años ha aumentado el interés por los preparados a base de plantas medicinales para el tratamiento de estos síntomas, sobre todo en aquellas mujeres que no deseen el tratamiento hormonal o esté contraindicado su uso^(2,3). Entre estas plantas medicinales, los rizomas y raíces de la cimicífuga (*Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.), planta herbácea procedente de Norte América, se han usado tradicionalmente para el tratamiento de diversos desórdenes ginecológicos⁽²⁻⁴⁾.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la eficacia de extractos de cimicífuga para el alivio de diversos síntomas asociados a la menopausia, tales como la sintomatología vasomotora (sofocos, sudores nocturnos) y psíquica (cambios de ánimo, irritabilidad, trastornos del sueño)⁽³⁻⁶⁾. Aunque su mecanismo de acción es controvertido, se considera que podría ejercer sus efectos por modulación selectiva de receptores estrogénicos (SERM), contribuyendo su actividad sobre diferentes sistemas de neurotransmisión (serotoninérgico, dopaminérgico)^(2,3-6). Estos efectos farmacológicos son debidos a la acción sinérgica de varios componentes, destacando los heterósidos triterpénicos derivados del cicloartano (acteína, 27-desoxiacteína, cimicifugósido, cimiacerósido A, cimiacemósidos A-H)⁽²⁻⁵⁾.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de los artículos publicados sobre la eficacia y seguridad de estos preparados en el tratamiento de la sintomatología menopáusica, especialmente en los síntomas vasomotores, con el fin de esclarecer su uso terapéutico en este síndrome.

Métodos

Se ha realizado una búsqueda de los artículos publicados desde enero de 2005 a marzo de 2021 en el buscador de recursos de la Universidad de La Laguna (ULL), “el Punto Q”, sobre la eficacia de los preparados de cimicífuga en los síntomas de la menopausia, especialmente en los síntomas vasomotores. PuntoQ es el portal de búsqueda de recursos electrónicos de información con fines académicos de la ULL, el cual permite hacer búsquedas desde un solo punto de acceso a 185 bases de datos, entre las

que se puede destacar para este trabajo: EBSCO, Biblioteca Cochrane Plus, BioMedCentral, CINAHL, PubMed, ScienceDirect Journals, Scopus, WOS o Wiley Online Library, entre otras.

Se introdujeron las siguientes palabras claves: (“Cimicifuga racemosa” OR “Actaea racemosa” OR “black cohosh” OR cimicifuga) en el título y (“menopausal symptoms” OR “hot flush*” OR “hot flash*” OR “vasomotor symptoms” OR menopaus* OR climacter*) y (“clinical trial” OR “clinical study” OR review OR trial) en todos los campos.

Se seleccionaron los ensayos clínicos que cumplieran los siguientes criterios de selección: estudios en mujeres peri-menopáusicas, menopáusicas o post menopáusicas con edad superior a 40 años y que usaran preparados de cimicifuga para tratar la sintomatología menopáusica, especialmente los síntomas vasomotores. Se incluyeron ensayos clínicos aleatorizados y controlados (con placebo u otra medicación), que tuvieran las palabras claves en el resumen, texto o título, tanto en inglés como en español. Se excluyeron los estudios en animales, ensayos clínicos no controlados o no aleatorizados, estudios de casos, resúmenes de congreso o aquellos que estuvieran en otro idioma. La adecuación de los estudios incluidos fue evaluada de forma independiente por dos investigadores, resolviendo cualquier discrepancia por consenso. Los estudios se agruparon en una tabla según las variables a estudio, con el fin de sistematizar y facilitar la comprensión de los resultados, considerando los siguientes datos: primer autor y año de publicación, tipo de estudio, población, duración del estudio y dosis, síntomas evaluados y resultados obtenidos.

Resultados

Al realizar la búsqueda con las palabras clave seleccionadas, se encontraron inicialmente 81 artículos. Aplicando los criterios de inclusión y exclusión, se excluyeron 67 artículos tras la lectura del título y resumen por los motivos reflejados en el diagrama de flujo (Figura 1). De los 14 artículos relevantes identificados, se excluyó uno tras lectura de texto completo por tratarse de un estudio observacional. Finalmente, quedaron 13 artículos que cumplían los criterios de inclusión, recogiéndose su información en la Tabla 1. Se puso en conjunto en la Tabla 1 los resultados de Charandabi et al.⁽¹⁰⁾ y Shahnazi et al.⁽¹¹⁾ porque era el mismo ensayo clínico, pero publicaron diferentes datos en dos revistas distintas.

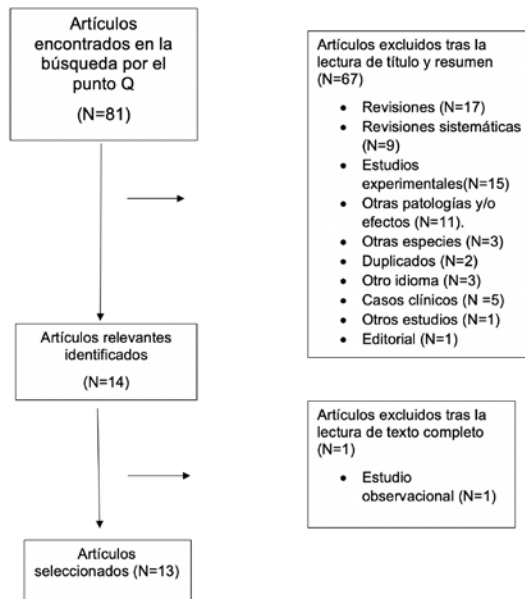


Figura 1. Identificación y selección de artículos (elaboración propia, siguiendo las recomendaciones de la declaración PRISMA).

De los 13 ensayos clínicos incluidos, 8 fueron aleatorizados, dobles ciegos y controlados con placebo^(7,9-12,14,16,18) y 4 fueron aleatorizados, dobles ciegos controlados con aceite de onagra⁽⁸⁾, tibolona⁽¹³⁾, dosis bajas de estradiol transdérmico⁽¹⁹⁾ o con placebo y estrógenos conjugados⁽¹⁷⁾. Uno de los ensayos clínicos fue aleatorizado y controlado con fluoxetina⁽¹⁵⁾. Además, cuatro de los ensayos eran multicéntricos^(12-14,18).

El número de pacientes incluidos en los ensayos clínicos oscilaba entre 49 y 84, menos en 5 que osciló entre 114 y 218^(7,12,13,15,18). Se seleccionaron pacientes peri- y /o postmenopáusicas con edades comprendidas entre 45 y 60 años, con presencia de amenorrea en los últimos 6-12 meses y síntomas menopáusicos de moderados a severos según diferentes escalas (índice de Kupperman, escala de Greene), especificando el número mínimo de sofocos en tres ensayos^(16,18,19).

La duración de los estudios osciló entre 8 y 12 semanas, exceptuando uno que duró 6 meses⁽¹⁵⁾. Se administraron cápsulas o comprimidos de diferentes extractos comerciales de rizoma de cimicífuga (CimifugolTM, Remifemin[®], Remixin[®], Klimadynon[®], Menoform[®])^(8,10,11,13,15,17,19) o extracto etanólico^(9,12,18). Un estudio⁽⁷⁾ administró un extracto etanólico de cimicífuga junto con un extracto etanólico de rodiola (Menopause Relief EP[®]), mientras que en otro⁽¹⁴⁾ se utilizó una mezcla de extractos de cimicífuga e hipérico (Gyno-Plus[®]). Además, un estudio⁽¹⁶⁾ administró una mezcla de extracto de soja, lino y cimicífuga (Euclim[®]). Las dosis administradas de extracto de cimicífuga oscilaron entre 5 mg⁽¹³⁾ y 1000 mg/día⁽⁷⁾ dependiendo del extracto utilizado, especificándose en la mayoría de los ensayos el contenido en glicósidos terpénicos^(8,10,11,14,16) o la proporción droga: extracto^(7,12,13,18,19).

La mayoría de los estudios evaluaron los síntomas menopáusicos mediante el índice de Kupperman^(7,9,12-16), si bien algunos estudios utilizaron otras escalas: MRS^(7,17,18) y GSC^(10,19). Además, se realizó un registro diario del número de sofocos y/o su severidad^(8,9,11,15,17-19) y se evaluó la calidad de vida mediante diferentes cuestionarios o escalas^(7,8,9,12,15) en varios estudios.

Tras el análisis de los resultados, se observó que la administración de los diferentes extractos de cimicífuga produjo una reducción significativa de los síntomas vegetativos (sofocos y sudores nocturnos) en la mayoría de los estudios comparado con el grupo placebo, excepto en dos de ellos^(9,18), y mostró una eficacia similar a los fármacos utilizados como referencia (tibolona⁽¹³⁾, estrógenos conjugados⁽¹⁷⁾ o dosis bajas de estradiol transdérmico⁽¹⁹⁾). Además, su administración mejoró los síntomas psicológicos (irritabilidad, cambios de ánimo, ansiedad, depresión)^(10-12,15,19), así como la calidad de vida⁽⁷⁻⁹⁾ y del sueño⁽¹⁷⁾ de las pacientes. Cuando se administró conjuntamente los extractos de cimicífuga y rodiola se encontró también una mejoría significativa de los síntomas menopáusicos, presentando una eficacia superior al placebo o al extracto de cimicífuga solo, independientemente de la dosis administrada⁽⁷⁾. Se debe resaltar que, en cinco de los trece ensayos clínicos revisados^(8,10,11,14,16), se usaron extractos de cimicífuga cuantificados en cuanto a su contenido en heterósidos triterpénicos (especialmente 27-desoixacteína), los cuales se consideran los principales principios activos^(2,4,5).

No se observaron ni comunicaron efectos adversos relevantes durante el tratamiento con los diferentes preparados de *Cimicifuga racemosa* en estos estudios, siendo las molestias gastrointestinales las más frecuentes^(7,12,14).

Tabla 1. Ensayos clínicos con *Cimicifuga racemosa* en el tratamiento de los síntomas de la menopausia.

Autor, Año, Referencia, Diseño	Pacientes	Duración, dosis	Síntomas Evaluados	Resultados
Pkhaldze et al., 2020 [7]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.	Mujeres (N = 220; 198 terminaron el estudio), edad media 52,5 ± 7,7 años, con síntomas menopáusicos moderados según ICD-10 y KMI.	<i>Duración:</i> 12 semanas. G.1 (N = 48): 413 mg/día Menopause Relief EP® (13 mg extracto CR EP-40® + 400 mg extracto RR EPR-7®). G.2 (N = 48): 13 mg/día extracto CR EP-40®. G.3 (N = 52): 1000 mg/día extracto CR EP-40®. G.4 (N = 50): 1200 mg/día placebo.	Evaluación de síntomas menopáusicos mediante las escalas KMI y MRS, calidad de vida mediante índice UQOL, al inicio, 6 y 12 semanas de tratamiento.	Combinación de cimicífuga y rodiola (G.1) fue más efectiva en mejoría de síntomas menopáusicos que cimicífuga sola (independiente de la dosis) ($p < 0,05$) o placebo ($p < 0,001$), y de la calidad de vida ($p < 0,001$), en especial síntomas psicológicos. No se observaron efectos adversos serios (los más frecuentes fueron molestias gastrointestinales).
Mehrpooya et al., 2018 [8]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con aceite de onagra.	Mujeres (N = 80), entre 45-60 años, con 12 meses sin menstruación y con sofocos.	<i>Duración:</i> 8 semanas. G.1 (N = 40): 80 mg/día Cimifugol™ (extracto seco CR conteniendo 0,17-0,18 mg/20 mg de 27- deoxiacetina). G.2 (N = 40): 1000 mg/día de aceite onagra (70-140 mg ácido gamma-linolénico).	Evaluación de severidad y número de sofocos mediante escala de Likert de 4 puntos y la calidad de vida mediante cuestionario MENQOL al inicio, 4 y 8 semanas de tratamiento.	Ambos grupos redujeron severidad de sofocos y mejoraron calidad de vida a 8 semanas comparado con inicio ($p < 0,05$) Solo cimicífuga redujo significativamente número de sofocos ($p < 0,05$). No se observaron efectos adversos.
Tanmahasanut et al., 2015 [9]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.	Mujeres (N= 54; 49 completaron estudio) peri-o postmenopáusicas (>40 años) con síntomas moderados o severos de menopausia según KMI (≥ 20).	<i>Duración:</i> 12 semanas. G.1 (N = 25): 40 mg/día de extracto etanólico 50% CR. G.2 (N = 24): placebo.	Evaluación de síntomas menopáusicos mediante KMI al inicio, 4, 8, 12, semanas de tratamiento, nº sofocos en un diario y calidad de vida mediante MENQOL al inicio y final tratamiento.	Ambos grupos mejoraron síntomas menopáusicos y calidad de vida, pero sin diferencia significativa entre ellos. No se observaron efectos adversos serios.
Mohammad-Alizadeh-Charandabi et al., 2013 [10]. Shahnazi et al., 2013 [11]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.	Mujeres (N = 84), entre 45-60 años, con 12 meses sin menstruación y con síntomas menopáusicos según la escala GCS.	<i>Duración:</i> 8 semanas. G.1 (N = 42): 6,5 mg/día de Cimifugol™ (extracto seco CR, 0,17-0,18 mg/20 mg de 27- deoxiacetina). G.2 (N = 42): placebo.	Evaluación de síntomas menopáusicos mediante escala GCS ¹⁰ y nº sofocos diarios y su severidad según GCS ¹¹ al inicio, 4 y 8 semanas de tratamiento.	Mejora síntomas menopáusicos (vasomotores y psíquicos), nº y severidad sofocos frente placebo a 4ª y 8ª semana ($p < 0,001$). No se observaron efectos adversos serios.

Autor, Año, Referencia, Diseño	Pacientes	Duración, dosis	Síntomas Evaluados	Resultados
Schellenberg et al., 2012 [12]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, multicéntrico, controlado con placebo.	Mujeres (N = 180; 166 terminaron estudio), edad media 51,7 años, con síntomas neurovegetativos menopáusicos según KMI al menos durante las 2 últimas semanas.	<i>Duración:</i> 12 semanas. G.1 (N = 57): 6,5 mg/día de extracto Ze 450 de raíz y rizoma CR (extracto etanólico (60%), 4,5-8,5:1). G.2 (N = 55): 13 mg/día Cimifemin®. G.3 (N = 54): placebo.	Evaluación de severidad de síntomas menopáusicos mediante KMI y calidad de vida mediante una escala analógica visual (VAS) al inicio y final de tratamiento.	↓ significativa (p < 0.001) dosis dependiente de severidad de síntomas menopáusicos frente placebo (vasomotores y psicológicos). No se observaron efectos adversos serios (molestias gastrointestinales).
Bai et al., 2007 [13]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, multicéntrico, controlado con tibolona.	Mujeres (N = 244), 218 terminaron estudio, edad entre 40-60 años, con síntomas menopáusicos según KMI (≥15).	<i>Duración:</i> 12 semanas. G.1 (N = 110): 5 mg/día iCR (Remifemin®) (40 mg/día droga seca). G.2 (N = 108): 2,5 mg/día de tibolona.	Evaluación de severidad de síntomas menopáusicos mediante KMI y frecuencia de efectos adversos al inicio, 4 y 12 semanas de tratamiento.	Mejoría similar síntomas menopáusicos en ambos grupos (84-85%). < incidencia efectos adversos con iCR (p < 0.01). G.2: leucorrea, dolor de pecho, sangrado vaginal.
Chung et al., 2007 [14]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, multicéntrico, controlado con placebo.	Mujeres (N= 89; 77 terminaron estudio) peri-o postmenopáusicas, edad media 51,02 años, con síntomas menopáusicos según KMI.	<i>Duración:</i> 12 semanas. G.1 (N = 42): 264 mg/día Gyno-Plus® (0.0364 mg extracto rizoma CR (1 mg glicósidos terpénicos) + 84 mg extracto etanólico HP (0,25 mg hipericina)). G.2 (N = 35): placebo.	Evaluación de severidad de síntomas menopáusicos mediante KMI al inicio, 4 y 12 semanas de tratamiento. Evaluación del nivel hormonal y perfil lipídico antes y después del tratamiento.	Mejoría significativa en síntomas menopáusicos y nº sofocos en semanas 4 y 12 frente placebo (p < 0,001). ↑ significativo nivel HDL en G.1 (p < 0,05). No se observaron efectos adversos serios (molestias gastrointestinales).
Oktem et al., 2007 [15]. Estudio prospectivo, aleatorizado, controlado con fluoxetina.	Mujeres (N= 120; 80 terminaron estudio) postmenopáusicas ≥ 1 año amenorrea, edad media 52.9 años, síntomas según KMI.	<i>Duración:</i> 6 meses. G.1 (N = 40): 40 mg/día extracto CR (Remixin®). G.2 (N = 40); 20 mg/día fluoxetina (Prozac®).	Evaluación nº e intensidad sofocos y sudores nocturnos en un diario, síntomas menopáusicos (KMI), depresión (BDS) y calidad de vida (cuestionario RAND-36) al inicio, 1, 2, 3 y 6 meses.	Mejoría de síntomas menopáusicos y depresivos en ambos grupos (p < 0.01). RC + efectiva (85%) que fluoxetina (62%) ↓ sudores nocturnos y sofocos a los 6 meses. ↓ síntomas depresivos > con fluoxetina. No se observaron efectos adversos serios, (< con CR).

Autor, Año, Referencia, Diseño	Pacientes	Duración, dosis	Síntomas Evaluados	Resultados
Sammartino et al., 2006 [16]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.	Mujeres (N = 80; 75 terminaron el estudio) postmenopáusicas, edad media 50,6 años, con número de sofocos \geq 7.	Duración: 12 semanas. G.1 (N = 36): 1 comp./día Euclim®: mezcla de 150 mg extracto soja (40% isoflavonas) + 100 mg extracto lino (20 % lignanos) + 50 mg extracto rizoma RC (2.5% triterpenos). G.2 (N = 39): placebo (suplementos con calcio).	Evaluación de severidad de síntomas menopáusicos mediante KMI al inicio y a los tres meses de tratamiento.	↓ significativa de síntomas menopáusicos comparado con placebo a los 3 meses ($p < 0,05$). No se observaron efectos adversos.
Wuttke et al., 2006 [17]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo y estrógenos conjugados (EC).	Mujeres (N = 62) postmenopáusicas, edad entre 40-60 años, con al menos 6 meses sin menstruación.	Duración: 12 semanas. G.1 (N = 20): 2 cápsulas/día de extracto BNO 1055 de RC (Klimadynon®/Menofem®; corresponde a 40 mg/día droga). G.2 (N = 22): 0,6 mg/día de EC (Oestrofeminal®). G.3 (N = 20): placebo.	Evaluación de síntomas menopáusicos según escala MRS al inicio, a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento. Anotación del n° de sudores nocturnos y calidad del sueño en un diario.	↓ significativa ($p < 0,05$) de síntomas menopáusicos (especialmente sofocos y sudores nocturnos) y mejora de calidad del sueño a las 12 semanas en grupos G.1 y G.2 comparado con placebo, teniendo una eficacia similar. No se observaron efectos adversos serios.
Kleiner et al., 2005 [18]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, multicéntrico, controlado con placebo.	Mujeres (N = 122) postmenopáusicas, edad entre 45-60 años, con número de sofocos \geq 3.	Duración: 12 semanas. G.1 (N = 81): 6.5 mg de extracto etanólico (60% v/v) de CR (4,5-8,5: 1; 42 mg droga). G.2 (N = 41): placebo.	Evaluación de síntomas menopáusicos con KMI y MRS, al inicio, a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento. Anotación n° de sofocos en un diario.	↓ síntomas menopáusicos y n° sofocos en ambos grupos, sin diferencia significativa. Mayor eficacia CR frente a placebo en subgrupo pacientes con KI \geq 20 ($p < 0,01$). No se observaron efectos adversos serios.
Nappi et al., 2005 [19]. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con dosis bajas de estradiol transdérmico.	Mujeres (N = 64), edad entre 45-55 años, con síntomas menopáusicos, con \geq 5 sofocos.	Duración: 12 semanas. G.1 (N = 32) 40 mg/día de extracto iCR (Remifemin®) G.2 (N = 32): 25µg cada 7 días de estradiol transdérmico en dosis baja + 10 mg/día dihidrogesteronona los últimos 12 días del tratamiento.	Evaluación síntomas menopáusicos mediante GCS, de ansiedad y depresión mediante SRT al inicio y al final del tratamiento. Anotación del n° de sofocos en un diario. Evaluación del perfil lipídico, nivel hormonal y función hepática.	↓ significativa ($p < 0,001$) n° de sofocos, ansiedad y depresión en ambos grupos frente valor inicial, pero sin diferencia significativa entre tratamientos. ↓ niveles de LDL en ambos grupos ($p < 0,003$). G.1 ↑ HDL ($p < 0,04$) y G.2 ↓ colesterol total ($p < 0,03$). No se observó efecto significativo en nivel hormonal ni función hepática.

BDS: Beck's Depression Scale. **BNO 1055:** Extracto etanólico (58% v/v) de rizoma de *Cimicifuga racemosa* (Klimadynon®/Menofem®); cada cápsula contiene 1,66-2,86 mg de extracto, que corresponde a 20 mg de droga vegetal). **CR:** *Cimicifuga racemosa*. **CR-EP40®:** Extracto etanólico de rizoma de *Cimicifuga racemosa* (4.5-8.5: 1; 60% etanol). **GCS:** Greene Climacteric Scale. **KMI:** Kupperman Menopausal Index.

ICR: Isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* rootstock (40% v/v; 0,78-1,14:1). **HP:** *Hypericum perforatum*. **MENQOL:** Menopause-Specific Quality of Life. **MRS:** Menopause Relief Scale. **RR-EPR7®:** Extracto etanólico de órganos subterráneos de *Rhodiola rosea* (2,5-5,0:1; 70% etanol). **SRT:** Symptom Rating Test. **UQOL:** Utian Quality of Life.

Discusión

La mayoría de los estudios incluidos en esta revisión evidencian que los preparados de cimicifuga pueden resultar útiles para aliviar la frecuencia e intensidad de los síntomas vegetativos de la menopausia, principalmente los sofocos y sudores nocturnos, observándose también una mejoría en los síntomas psicológicos^(10-12,15,19) y en la calidad de vida⁽⁷⁻⁹⁾. Además, estos preparados han sido bien tolerados a las dosis administradas, siendo los efectos adversos más frecuentes las molestias gastrointestinales^(7,12,14).

No obstante, se ha de comentar que si bien el diseño de la mayoría de los ensayos tenía un grado aceptable de calidad (aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo u otros preparados), la comparación e interpretación de los resultados resultó difícil por diferentes motivos. Así, se encontraron diferencias en el número de pacientes incluidas, siendo en algunos estudios muy pequeño (49), lo que limita el poder estadístico del estudio y la fiabilidad de los resultados. También se observó variabilidad en los criterios de selección de la población analizada (diferente grado de severidad de síntomas) y en la forma de valorar los síntomas menopáusicos, especialmente los bochornos (síntomas subjetivos y difíciles de evaluar). Un total de 7 estudios utilizaron como medida el recuento numérico de sofocos y/o su severidad^(8,9,11,15,17-19), otros siete utilizaron el índice de Kupperman^(7,9,12-16), y otros valoran los síntomas vegetativos mediante otros sistemas^(7,10, 17-19).

Asimismo, se ha encontrado una gran heterogeneidad no solo en la dosis sino en las formulaciones administradas, si bien predominaron los extractos comerciales de extractos de rizoma de cimicifuga, bien solos o combinados (extractos de rodiola, hipérico, soja o lino) en los que se especificaba el contenido de principios activos^(8,10,11,14,16) y/o la proporción droga: extracto^(7,12,13,18,19).

Aunque no está claro todavía cuáles son los principios activos del rizoma de cimicifuga, se considera que los heterósidos triterpénicos derivados del cicloartano (saponósidos) (acteína, 27-desoixacteína, cimicifugósido, cimiacerósido A, cimiacerósido A-H) son los principales constituyentes a los que se les atribuye la mayoría de las acciones farmacológicas^(2,5). De hecho, cinco de los ensayos clínicos incluidos en esta revisión utilizaron extractos de cimicifuga estandarizados en su contenido en derivados triterpénicos (especialmente en 27-deoixacteína)^(8,10,11,14,16).

En cuanto a la posología recomendada, según la Agencia Europea del Medicamento (EMA), la dosis diaria es de 5,6-6,5 mg de extracto seco alcohólico (58% v/v; 5-10:1 y 60% v/v; 4,5-8,5:1) o 5 mg de extracto seco isopropanólico (40%, v/v; 6-11:1), por vía oral, equivalente a 40 mg/día de droga seca^(2,5). En la gran mayoría de los estudios de nuestra revisión se siguieron las recomendaciones de la EMA, oscilando la dosis de los extractos secos etanólicos entre 6,5 y 40 mg/día^(7,9-12,17,18), mientras que la dosis de los extractos isopropanólicos fue de 5 y 40 mg/día^(13,19).

También merece la pena comentar que se observó un efecto placebo alto en dos de los ensayos incluidos en esta revisión^(9,18), lo que dificultó aún más la valoración correcta de los resultados obtenidos.

No obstante, a pesar de las dificultades encontradas a la hora de establecer comparaciones entre los diferentes ensayos clínicos, los datos disponibles sugieren que los extractos de cimicifuga pueden ser útiles para el tratamiento de los síntomas vegetativos (sofocos y sudores nocturnos) y psicológicos de la menopausia, ya que produjeron una disminución en la frecuencia e intensidad de esta sintomatología, así como una mejora de la calidad de vida de estas pacientes, sin presentar efectos adversos destacables.

Por otro lado, se ha observado en un ensayo⁽⁷⁾ que la combinación de extractos de cimicífuga con extractos de rodiola (*Rhodiola rosea* L.) resultaba más efectiva en la mejoría de la sintomatología menopáusica que la cimicífuga sola (independientemente de la dosis), por lo que se deberían realizar más estudios que analicen mejor estos efectos.

Conclusión

La consideración conjunta de los estudios revisados permite concluir que los extractos de *Cimicifuga racemosa* pueden ser eficaces y seguros para el tratamiento de los síntomas vegetativos y psicológicos de la menopausia, constituyendo una alternativa importante para aquellas mujeres que no deseen o no puedan ser tratadas con terapia hormonal.

No obstante, debido a la heterogeneidad de los estudios revisados, son necesarios más ensayos clínicos con suficiente número de pacientes y tiempo de estudio, uso de preparaciones estandarizadas en cuanto a su composición, así como con criterios similares de inclusión y valoración de los síntomas menopáusicos.

Bibliografía

1. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el abordaje de síntomas vasomotores y vaginales asociados a la menopausia y postmenopausia. Guía de Práctica Clínica sobre el abordaje de síntomas vasomotores y vaginales asociados a la menopausia y postmenopausia. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA); 2017. Guía de Práctica Clínica en el SNS.
2. Allué J, Alonso MJ. Fitoterapia ginecológica. En: Castillo García E, Martínez Solís I, editoras. Manual de fitoterapia. 2ª Edición. Barcelona: Elsevier España, S.L.U.; 2016. p. 337-351.
3. Dietz BM, Hajirahimkhan A, Dunlap TL, Bolton JL. Botanicals and their bioactive phytochemicals for women's health. *Pharmacol Rev.* 2016; 68: 1026- 1073. <http://dx.doi.org/10.1124/pr-115.010843>.
4. Guo Y, Wang X, Zhang F, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: a review. *J Ethnopharmacol.* 2017; 209: 264-282. doi: 10.1016/j.jep.2017.07.040.
5. Vanaclocha B, Cañigual S, Fitoterapia, Vademécum de prescripción. 5ª ed. Barcelona: Elsevier España, S.L.U.; 2019 p. 231- 232.
6. Wuttke W, Seidlová-Wuttke D. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) is a non-estrogenic alternative to hormone replacement therapy. *Clin Phytoscience.* 2015; 1: 12. doi: 10.1186/s40816-015-0013-0.
7. Pkhaladze L, Davidova N, Khomasuridze A, Shengelia R, Panossian A. *Actaea racemosa* L. is more effective in combination with *Rhodiola rosea* L. for relief of menopausal symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pharmaceuticals.* 2020; 21 May; 13 (5): 102. doi: 10.3390/ph13050102.
8. Mehrpooya M, Rabiee S, Larki-Harchegani A, et al. A comparative study on the effect of black cohosh and evening primrose oil on menopausal hot flashes. *J Edu Health Promot.* 2018; 7: 36. doi: 10.4103/jehp.jehp_81_17.
9. Tanmahasamut P, Vichinsartvichai P, Rattanachaiyanont M, Techatraisak K, Dangrat C, Sardod P. *Cimicifuga racemosa* extract for relieving menopausal symptoms: a randomized controlled trial. *Climate-ric.* 2015; 18: 79-85. doi: 10.3109/13697137.2014.933410.
10. Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Shahnavi M, Nahaee J, Bayatipayan S. Efficacy of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) in treating early symptoms of menopause: a randomized clinical trial. *Chinese Med.* 2013; 8:20. doi: 10.1186/1749-8546-8-20.

- 11.** Shahnazi M, Nahee J, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Bayatipayan S. Effect of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on vasomotor symptoms in postmenopausal women: a randomized clinical trial. *J Caring Sci.* 2013; 2(2): 105-113. doi: doi:10.5681/jcs.2013.013.
- 12.** Schellenberg R, Saller R, Hess L, et al. Dose-dependent effects of the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 in the treatment of climacteric complaints: a randomized, placebo-controlled study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 260301. doi: 10.1155/2012/260301.
- 13.** Bai W, Zepelin H, Wang S, et al. Efficacy and tolerability of a medicinal product containing an isopropanolic black cohosh extract in Chinese women with menopausal symptoms: a randomized, double blind, parallel-controlled study versus tibolone. *Maturitas.* 2007; 58: 31-41. doi: 10.1016/j.maturitas.2007.04.009.
- 14.** Chung D-J, Kim H-Y, Park K-H, et al. Black cohosh and St. John's wort (GYNO-Plus®) for climacteric symptoms. *Yonsei Med J.* 2007; 48 (2): 289-294. doi: 10.3349/ymj.2007.48.2.289.
- 15.** Oktem M, Eroglu D, Karaham H, Taskintuna N, Kuscü E, Zeyneloglu HB. Black cohosh and fluoxetine in the treatment of postmenopausal symptoms: a prospective, randomized trial. *Adv Ther.* 2007; 24 (2): 448-461. doi: 10.1007/BF02849914.
- 16.** Sammartino A, Tommaselli GA, Gargano V, Di Carlo C, Attianese W, Nappi C. Short-term effects of a combination of isoflavones, lignans and *Cimicifuga racemosa* on climacteric-related symptoms in postmenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Gynecol Endocrinol.* 2006; 22 (11): 646-650. doi: 10.1080/09513590601010722.
- 17.** Wuttke W, Raus K, Gorkow C. Efficacy and tolerability of the black cohosh (*Actaea racemosa*) ethanolic extract BNO 1055 on climacteric complaints: A double-blind, placebo- and conjugated estrogens-controlled study. *Maturitas.* 2006; 55S: S83-S91. doi: 10.1016/j.maturitas.2006.06.020.
- 18.** Frei-Kleiner S, Schaffner W, Rahlfs VW, Bodmer Ch, Birkäuser M. *Cimicifuga racemosa* dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Maturitas.* 2005; 51: 397-404. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.10.003.
- 19.** Nappi RE, Malavasi B, Brundu B, Facchinetti F. Efficacy of *Cimicifuga racemosa* on climacteric complaints: a randomized study versus low-dose transdermal estradiol. *Gynecological Endocrinol.* 2005; 20 (1): 30-35. doi: 10.1080/09513590400020922.

doi: 10.30827/ars.v63i2.22199

Artículos de revisión

Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina

Nanoantibodies applications in medicine

Celeste Ortega-Monge¹  0000-0002-8384-9987

Noelia Arce-Rodríguez¹  0000-0002-6183-5891

Maripaz Santamaría-Muñoz¹  0000-0001-7720-4042

Marianela Chavarria-Rojas^{1,2}  0000-0002-0507-6982

María Fernanda Rojas Salas^{1,2}  0000-0001-6375-1387

Eleaneth Baltodano Viales^{1,2}

German L. Madrigal Redondo^{1,2}  0000-0002-9856-4044

¹Universidad de Costa Rica, Facultad de Farmacia, San José, Costa Rica.

²Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, San José, Costa Rica.

Correspondencia

Marianela Chavarria-Rojas
marianela.chavarria@ucr.ac.cr

Recibido: 08.09.2021

Aceptado: 25.01.2022

Publicado: 21.04.2022

Agradecimientos

Se le agradece al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas por todo el apoyo que dieron para realizar este artículo, así como a su director el Dr. German Madrigal Redondo.

Financiación

Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), Universidad de Costa Rica

Conflicto de intereses

Los autores dejan constancia que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con la investigación realizada en el presente artículo.

Resumen

Introducción: Los nanoanticuerpos están compuestos únicamente por la región variable de la cadena pesada y se obtienen a partir de algunas especies de camélidos y tiburones. Tienen alta capacidad de unión, alta especificidad, tamaño pequeño, alta accesibilidad y alta penetración de los tejidos, por lo que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento, diagnóstico y prevención de diferentes enfermedades.

Método: Se realizó una revisión bibliográfica de las aplicaciones médicas de los nanoanticuerpos. Se examinaron artículos científicos publicados en inglés y español desde 2015 a 2021 en las bases de datos Google Académico, Elsevier, PubMed, Clinical trials, Annual Reviews y ScienceDirect. Se prefirieron los estudios que demostraron mayor valor según el idioma, veracidad de la información y fecha de publicación.

Resultados y discusión: En total, se seleccionaron 21 artículos para ser evaluados y analizados, de los cuales 20 fueron estudios preclínicos y un estudio clínico. Los nanoanticuerpos destacan como alternativas terapéuticas, diagnósticas y preventivas contra el cáncer, la hepatitis C, el Alzheimer, el Parkinson, la diarrea provocada por rotavirus y el COVID-19.

Conclusiones: Los nanoanticuerpos pueden ser de gran utilidad para la prevención, diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades; sin embargo, se requiere continuar con el desarrollo de estudios clínicos y preclínicos que respalden la seguridad y eficacia de estos fármacos.

Palabras clave: anticuerpos; nanoanticuerpos; neoplasia; hepatitis; enfermedad de Alzheimer; Parkinson; diarrea; SARS-CoV-2.

Abstract

Introduction: Nanoantibodies are composed solely of the variable region of the heavy chain and are obtained from some species of camelids and sharks. They have high binding capacity, high specificity, small size, high accessibility, and high tissue penetration, so they could potentially be used to treat, diagnose, and prevent several diseases.

Method: A bibliographic review of the medical applications of nanoantibodies was carried out. Scientific articles were examined, published in English and Spanish from 2015 to 2021 in Google Academic, Elsevier, PubMed, Clinical trials, Annual Reviews, and ScienceDirect databases. Studies that showed greater value according to language, information accuracy, and publication date were preferred.

Results and discussion: 21 articles were selected to be evaluated and analyzed, of which 20 were preclinical studies and one clinical study. Nanoantibodies stand out as therapeutic, diagnostic, and preventive alternatives against cancer, hepatitis C, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diarrhea caused by rotavirus, and COVID-19.

Conclusions: Nanoantibodies can be very useful for the prevention, diagnosis, and treatment of different diseases; however, it is necessary to continue developing clinical and preclinical studies that support the safety and efficacy of these drugs.

Keywords: antibodies; nanoantibodies; neoplasms; hepatitis; Alzheimer disease; Parkinson; diarrhea; SARS-CoV-2.

Puntos clave

Los nanoanticuerpos son de gran relevancia en el área de la medicina, están compuestos únicamente por la región variable de la cadena pesada. Debido a su alta capacidad de unión, especificidad, tamaño pequeño, alta accesibilidad y penetración en los tejidos, se han vuelto una de las principales alternativas para tratar patologías, al igual que los anticuerpos policlonales y monoclonales.

Se han descrito diferentes estudios preclínicos para estudiar la efectividad y aplicabilidad de los nanoanticuerpos en la medicina. En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica y los estudios consultados indican que los nanoanticuerpos son una herramienta prometedora para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, es de suma importancia continuar con el desarrollo de estudios clínicos que evidencien la eficacia y seguridad de los nanoanticuerpos.

Introducción

Las células plasmáticas secretan anticuerpos (Abs) en respuesta a un antígeno (Ag). Estos anticuerpos también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas que forman parte fundamental de la respuesta inmune humoral, debido a que reconocen y reaccionan de manera específica a determinado antígeno⁽¹⁾. Se encuentran conformadas por dos cadenas ligeras iguales y dos cadenas pesadas simétricas, ambas unidas por puentes disulfuro y uniones no covalentes como las fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van Der Waals⁽²⁾.

Las cadenas ligeras están compuestas por un dominio constante y un dominio variable, mientras que las cadenas pesadas están constituidas por tres dominios constantes y uno variable. El Ab se une con el Ag en las regiones de determinación complementaria (CDR) que se encuentran en la cadena pesada y en la ligera^(2,3).

Los Abs policlonales y monoclonales son los que más se han utilizado en la industria farmacéutica; no obstante, no tienen suficiente especificidad y sensibilidad respectivamente, y su estabilidad disminuye con el tiempo⁽⁴⁾. Por esta razón, se han desarrollado nanoanticuerpos (nAbs), compuestos únicamente por la región variable de la cadena pesada⁽⁵⁾. Los nAbs se obtienen a partir de camélidos y tiburones y tienen una alta capacidad de unión y especificidad a pesar de que no cuentan con cadenas ligeras. Además, tienen un tamaño pequeño, alta accesibilidad y penetración en los tejidos⁽⁴⁾.

Las especies de tiburones pertenecientes a la familia *Orectolobidae* y las especies *Ginglymostoma cirratum* y *Galeorhinus galeus* son capaces de producir Ig constituidas solamente con la cadena pesada⁽⁶⁾, las cuales contienen de tres a cinco dominios constantes. Estos nAbs derivados de tiburón (IgNAR) tienen un tamaño aproximado a 73 kDa y se pueden encontrar en diferentes longitudes dependiendo de si es una Ig transmembranal o de secreción⁽⁷⁾. Las IgNAR tienen una vida media modificable, mayor solubilidad, estabilidad y capacidad de penetración en los tejidos; no obstante, pueden presentar inmunogenicidad, lo que podría afectar sus aplicaciones clínicas⁽⁸⁾.

Por otro lado, entre los camélidos utilizados para este propósito se encuentran las especies *Lama glama*, *Vicugna pacos*, *Vicugna vicugna* y *Camelus* sp., pues en su suero se puede encontrar Abs heterodiméricos convencionales compuestos sólo por cadenas pesadas⁽⁹⁾. Estos nAbs derivados de camélidos (VHH) tienen un tamaño de 15 kDa, son las moléculas más pequeñas que se encuentran en la naturaleza capaces de reconocer a un Ag con una alta afinidad y especificidad. Además, tienen la capacidad de acceder a epítomos ocluidos, elevada estabilidad térmica y física, alta penetración en los tejidos tumorales, alta resistencia al proceso de pasteurización y alta versatilidad que facilita su expresión en sistemas como levaduras, bacterias y células de mamíferos⁽¹⁰⁾.

Dentro de las principales ventajas que poseen los nAbs se encuentra su estabilidad incluso en condiciones adversas y con temperaturas extremas durante periodos extensos, además presentan una alta biocompatibilidad, especificidad y diversidad, lo que permite su uso en gran cantidad de tratamientos para diversas enfermedades. Por otra parte, se debe considerar que presentan una inmunogenicidad débil en humanos que podría aumentar con el uso a largo plazo⁽¹¹⁾.

Los nAbs se han utilizado extensamente en las áreas de investigación, farmacoterapia, biofarmacia, diagnóstico y nanorreactivos,⁽⁹⁾ por lo que esta revisión tiene como objetivo ejemplificar algunos de los usos y aplicaciones más comunes de los nAbs en la medicina.

Métodos

La metodología empleada consistió en una revisión bibliográfica de distintas fuentes de información, donde se consultó las bases de datos Google Académico, Elsevier, PubMed, Clinical trials, Annual Reviews y ScienceDirect. Se utilizaron las siguientes palabras clave: anticuerpos; nanoanticuerpos; neoplasia; enfermedad de Alzheimer; camello; hepatitis; parkinson; diarrea; SARS-CoV-2. Los términos se consultaron en inglés y español en un rango temporal del 2015-2021; sin embargo, existen artículos secundarios de años anteriores al 2015 que se utilizaron por ser referencias citadas en los artículos primarios. Los criterios de elegibilidad de las publicaciones incluyen estudios originales que describen estudios preclínicos *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos sobre los usos que tienen los nAbs en la medicina. Se seleccionaron los artículos que demostraron un mayor valor para desarrollar la investigación según el idioma, veracidad de la información, fecha de publicación, entre otros.

Para definir nAbs se utilizaron tres artículos, sobre el uso de nAbs en cáncer se consultaron ocho artículos, en hepatitis cinco artículos, en enfermedad de Parkinson diez artículos, en enfermedad de Alzheimer (EA) cinco artículos, en diarrea causada por rotavirus diez artículos y en COVID-19 ocho artículos. Se utilizaron en total 21 artículos científicos, de los cuales nueve corresponden a estudios preclínicos *in vitro*, 11 a estudios preclínicos *in vivo* y uno es un estudio clínico.

Los estudios publicados se clasificaron según su aplicación: Detección del cáncer, concretamente uno de ellos investiga el impedimento de su propagación, y otro la reducción de su recurrencia. Otro estudio acerca de la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C (VHC). Dos acerca del diagnóstico y otros dos sobre la prevención de la enfermedad de Alzheimer (EA). Dos sobre el impedimento de la propagación del Parkinson, y uno acerca del alivio e impedimento de su deterioro. Además, se utilizaron tres estudios sobre la prevención y tratamiento de diarrea causada por *Rotavirus*, así como un estudio para el desarrollo de una vacuna contra la diarrea causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Finalmente, se utilizaron tres estudios que versan sobre la prevención de la COVID-19, uno de ellos estudia la neutralización del virus y otro la neutralización del daño celular causado por el mismo.

Resultados y Discusión

Se evaluaron en total 21 artículos científicos, como se observa en la Tabla 1, donde se describen las aplicaciones más destacadas de los nAbs. Por ejemplo, su capacidad de disminuir la propagación del cáncer y del Parkinson, inhibir la replicación del VHC y prevenir la EA. También se utilizan en el diagnóstico de la EA y como estrategia para la prevención de la COVID-19, enfermedad causada por el SARS-CoV-2.

Todos los ensayos realizados en las publicaciones mencionadas corresponden a ensayos en fase preclínica salvo el descrito en la publicación⁽¹⁵⁾ que corresponde a un trabajo en fase clínica. A continuación, se explican cada uno de estos estudios de manera más detallada.

Tabla 1. Descripción de los estudios preclínicos *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos sobre los usos y aplicaciones de los nAbs en la medicina.

<i>Detección del Cáncer</i>	
Selección de nAbs específicos contra la α -fetoproteína (AFP), lo que permitió la detección ultrasensible de biomarcadores de cáncer.	Chen et al., 2016 ⁽¹²⁾
<i>Impedimento de la propagación del Cáncer</i>	
Uso de nAbs CAPNb2 contra CapG humano para impedir la formación de lesiones metastásicas o migración celular en el cáncer de mama.	Van et al., 2013 ⁽¹³⁾
Desarrollo de nAbs dirigidos al receptor de quimiocinas (US28) para alterar el crecimiento tumoral en los glioblastomas (GMB).	Heukers et al., 2018 ⁽¹⁴⁾
<i>Reducción de la recurrencia del Cáncer</i>	
Uso de células CAR-T derivadas de nAbs bioespecíficos en linfoma B en período de recaída para evaluar la seguridad y eficacia de las mismas.	Henan Cancer Hospital. 2019 ⁽¹⁵⁾
<i>Inhibición de la replicación de la Hepatitis C</i>	
Desarrollo de nAbs con clones de <i>E. coli</i> para penetrar e inhibir el virus.	Jittavisutthikul et al., 2015 ⁽¹⁶⁾
<i>Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer</i>	
Uso de los VHH como sondas específicas para dianas localizadas en el cerebro, como posible herramienta diagnóstica.	Li et al., 2016 ⁽⁵⁾
Estudio de los VHH conjugados químicamente en la resonancia magnética de la EA, para el diagnóstico de imágenes moleculares <i>in vivo</i> .	Vandesquille et al., 2017 ⁽¹⁷⁾
<i>Prevención de la Enfermedad de Alzheimer</i>	
Uso de los VHH para inhibir la actividad β -secretasa e impedir la generación de β -amiloide y por ende su acumulación, lo que permitiría detener el progreso de la EA.	Dorresteijn et al., 2015 ⁽¹⁸⁾
Uso de VHH anti BACE1 por medio de virus adenoasociados (AAV), para disminuir la cantidad de β -amiloide en ratones con la EA. Se evaluó la posibilidad de combinar los VHH con vectores virales para dirigirse a una proteína diana en el sistema nervioso central (SNC).	Rincon et al., 2019 ⁽¹⁹⁾
<i>Impedimento de la propagación del Parkinson</i>	
Uso de los nAbs VH14PEST para contrarrestar los efectos tóxicos de la proteína α -sinucleína (α -Syn), que forma agregados facilitadores de degeneración neuronal.	Butler et al., 2016 ⁽²⁰⁾
Uso de los nAbs para reducir la toxicidad de la α -Syn mediante la implementación de un mecanismo novedoso, lo cual es significativo en términos terapéuticos.	Marija et al., 2015 ⁽²¹⁾
<i>Alivio e impedimento del deterioro del Parkinson</i>	
Orientación selectiva de los nAbs VH14*PEST y NbSyn87*PEST hacia la α -Syn. Se demostró que el primero es capaz de sostener el tono dopaminérgico.	Chatterjee et al., 2018 ⁽²²⁾
<i>Prevención de la diarrea por Rotavirus</i>	
Uso de VHH anti-VP6 en estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en ratones. Se demostró la neutralización del virus.	Maffey. 2016 ⁽²³⁾
<i>Tratamiento y diagnóstico de diarrea por Rotavirus</i>	
Uso de VHH para el desarrollo del primer biofármaco antiviral para tratar diarrea por <i>Rotavirus</i> en neonatos humanos.	Mendez. 2004-2019 ⁽²⁴⁾
<i>Inhibición y tratamiento de la diarrea por Rotavirus</i>	
Inhibición de la propagación del <i>Rotavirus</i> mediante el uso de VHH anti-VP6.	Crowell et al., 2021 ⁽²⁵⁾
<i>Desarrollo de una vacuna contra la diarrea causada por ETEC</i>	
Observación de la efectividad de los VHH para reducir la colonización de ETEC y su uso en la ingeniería inversa para el desarrollo de una vacuna.	Amcheslavsky et al., 2021 ⁽²⁶⁾
<i>Prevención de la COVID-19</i>	
Uso de VHH para el bloqueo de la unión de la proteína de espiga del virus con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2, como prevención de la propagación del virus.	Pedreáñez et al., 2021 ⁽⁹⁾

<i>Tratamiento preventivo contra la COVID-19</i>	
Desarrollo de una biblioteca de VHH e identificación de su potencial como tratamiento preventivo contra la COVID-19.	Esperbent, 2020 ⁽²⁷⁾
<i>Neutralización de diversas variantes de la COVID-19</i>	
Uso de un “cocktail” de nAbs para neutralizar diversas variantes de la COVID-19.	Zhou et al., 2021 ⁽²⁸⁾
<i>Prevención y neutralización de la COVID-19</i>	
Evidencia la importancia de VHH en la respuesta inmune contra el virus y su inhibición mediante un tratamiento profiláctico.	Hasson et al., 2020 ⁽²⁹⁾
<i>Neutralización de daño celular causado por la COVID-19</i>	
Demostración de una neutralización cercana al 50% del daño celular causado por la COVID-19, por parte de los nAbs.	Djemli et al., 2021 ⁽³⁰⁾

Cáncer

El cáncer es una patología celular que agrupa diversos orígenes. Su fisiopatología es difícil de describir, ya que involucra distintas entidades clínicas⁽³¹⁾; a pesar de esto, ha sido posible un consenso de principios comunes entre estas⁽³²⁾. El cáncer se inicia cuando las células se dividen de forma anormal y descontrolada, lo que conlleva a la formación de agregados que representan un crecimiento dañino para los tejidos adyacentes y alteran la fisiología normal del organismo⁽³¹⁾. Este proceso puede afectar a los demás tejidos del cuerpo, causando metástasis y la muerte⁽³³⁾.

Actualmente se siguen buscando diferentes potenciales terapéuticos tanto para el diagnóstico como para la terapia del cáncer; un ejemplo de esto es el uso de los nAbs. La eficacia terapéutica de estos está respaldada por diferentes experimentaciones sobre adhesión y migración celular, perturbación de vías de señalización, angiogénesis y proliferación celular. Por ejemplo, existen tumores de difícil acceso que pueden ser visualizados por medio de imágenes moleculares debido a la acumulación homogénea de los nAbs, lo que permite la detección de biomarcadores cancerígenos⁽³⁴⁾. Estas son moléculas asociadas a mutaciones genéticas o alteraciones epigenéticas que determinan la predisposición de un individuo a diferentes tipos de cáncer⁽¹²⁾.

Una ventaja de los nAbs es su pequeño tamaño que permite una penetración tumoral más homogénea y profunda⁽³⁴⁾, además de facilitar la unión a antígenos localizados en tejidos difícilmente accesibles⁽³⁵⁾, por ejemplo, atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)⁽³⁶⁾. Una desventaja de los nAbs es su corta vida media *in vivo*⁽³⁴⁾. Sin embargo, su tamaño ha sido fundamental para los mecanismos que utilizan estas moléculas en la terapia y diagnóstico del cáncer. Los nAbs son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales, puesto que actúan contra las proteínas de superficie de dichas células, lo cual altera su funcionamiento e induce a la apoptosis debido al bloqueo de la señalización a través de un receptor de factor de crecimiento⁽³⁷⁾.

Aunado a lo anterior, cuando los nAbs están dirigidos a tumores, se pueden unir a los antígenos de manera muy similar a como lo hacen los Abs convencionales, la diferencia radica en que los nAbs son capaces de acceder a epítomos que no son reconocidos por los Abs⁽³⁸⁾.

En los estudios preclínicos es necesario recalcar las aplicaciones de estas moléculas, un ejemplo es el uso de animales tales como alpacas inmunizadas contra la α -fetoproteína (AFP), la cual es producida por diversos tumores como carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma. En estudios previos, se seleccionaron nAbs específicos para la AFP y los resultados demostraron que presentan alta solubilidad, reproducibilidad y afinidad. De esta forma, se evidencia que un inmunoensayo mediado por nAbs brinda futuras aplicaciones para detectar biomarcadores de cáncer⁽¹²⁾.

Actualmente existen nAbs disponibles para dianas tumorales específicas, por ejemplo, en cáncer de mama se evaluó un nAbs conocido como CAPNb2 en un modelo animal de ratones desnudos. La sobreexpresión del componente del citoesqueleto de actina (CapG) se ha relacionado con la diseminación de las células tumorales en este tipo de cáncer. De esta forma, se estudió la propagación de las células cancerígenas después de administrar los CAPNb2 contra el CapG humano. Este estudio demostró que CAPNb2 interactúa con CapG en el espacio citoplasmático, restringe la migración celular e impide la formación de lesiones metastásicas en los modelos animales estudiados. A partir de estos hallazgos, se

ha promovido una iniciativa para el diseño de fármacos utilizando CAPNb2, pues la inhibición del CapG disminuye de forma significativa la metástasis del cáncer de mama⁽¹³⁾.

Por otro lado, el glioblastoma (GMB) es el cáncer de cerebro más agresivo que existe, además de ser incurable, se caracteriza por expresar proteínas específicas, así como el receptor de quimiocinas US28, que conducen a vías de señalización inflamatorias y proliferativas. Por esta razón se desarrollaron nAbs dirigidos al receptor US28 capaces de unirse a su dominio extracelular, lo cual altera el crecimiento tumoral *in vitro*. En este estudio se enfatiza el potencial terapéutico de los nAbs para el tratamiento de GMB⁽¹⁴⁾.

Actualmente, en el Hospital de Cáncer Henan se desarrolla un estudio clínico que se encuentra en período de reclutamiento de pacientes. El objetivo es evaluar el funcionamiento de células CAR-T productoras de nAbs biespecíficos para CD19 y CD20, antígenos presentes en el linfoma de células B. Las CAR-T son capaces de disminuir la recurrencia del linfoma en pacientes con recaídas; sin embargo, el estudio aún no ha finalizado⁽¹⁵⁾. Por tanto, sería deseable que se desarrollaran más estudios clínicos, ya que los nAbs han evidenciado un potencial terapéutico realmente significativo en cáncer.

Hepatitis

Los virus de la Hepatitis B (VHB) y C (VHC) pueden llegar a causar la muerte del paciente tras una infección persistente. El VHB se caracteriza por ser un virus ADN, mientras que el VHC es de tipo ARN y ambos tienen la posibilidad de causar infección tanto en humanos como en chimpancés⁽³⁹⁾. La forma de transmisión es por contacto con sangre o fluidos corporales infectados⁽⁴⁰⁾. Esta enfermedad tiene ciertos niveles de afectación crónica en el hígado y con el progreso puede desarrollar fibrosis y carcinoma hepatocelular⁽⁴¹⁾.

La explicación de la fisiopatología de la hepatitis no es sencillo, incluso los receptores de ambos virus no están completamente estudiados, pero se conoce que los hepatocitos son el principal sitio de infección debido a que cuando el virus ingresa al organismo, los polipéptidos de su envoltura interactúan con su membrana celular⁽³⁹⁾. Actualmente, más de 170 millones de personas están afectadas por el VHC de manera crónica, por esta razón, es necesario desarrollar terapias novedosas para su tratamiento⁽⁴²⁾.

Los recientes estudios con nAbs han demostrado su poder inhibitorio sobre la replicación del VHC y su capacidad de reducir el ARN viral en el interior de los hepatocitos. Además, los nAbs penetrables participan en la respuesta inmune innata de la supresión viral y toleran las mutaciones del VHC.

Se realizó un estudio donde se evaluó el uso de los nAbs como posible tratamiento de infecciones por VHC. Los Abs se obtuvieron a partir de *E. coli* como sistema de expresión y su capacidad de penetración en las células hepáticas humanas se demostró mediante un ELISA. El mecanismo de penetración e inhibición es complejo, pero se determinó que con los nAbs es posible desarrollar agentes inmunoterapéuticos sumamente eficientes para pacientes infectados⁽¹⁶⁾. Este estudio es el único que respalda el uso de los nAbs en esta patología, lo que motiva y justifica la importancia de darle continuidad a esta investigación en otras ramas de la enfermedad u otros mecanismos mediante los cuales los nAbs podrían inhibir la replicación del VHC.

Alzheimer

La EA es el trastorno neurodegenerativo más importante que afecta la corteza cerebral⁽⁴³⁾ y se caracteriza por una acumulación de depósitos de proteínas tau y amiloides en el cerebro⁽⁴⁴⁾. Los pacientes con EA sufren una pérdida progresiva de la función cognitiva que inicia con un déficit de memoria, conforme avanza la enfermedad se presentan alteraciones del lenguaje, pérdida de la independencia y problemas cognitivos mayores y cada vez más limitantes. En la etapa terminal los pacientes pueden presentar delirio, razonamiento alterado, rigidez e incapacidad de realizar por sí mismos sus funciones básicas⁽⁴³⁾.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de enfermedades neurodegenerativas se va a triplicar en los siguientes 30 años, por lo que ha surgido la necesidad de buscar terapias efectivas para la prevención y tratamiento de éstas, como es el uso de nanopartículas⁽⁴⁵⁾.

Los VHH tienen un gran futuro para el diagnóstico de imágenes moleculares *in vivo*, debido a que son muy específicos para su antígeno diana, son estables en el tiempo y difunden fácilmente en los tejidos. Además, se pueden humanizar de manera sencilla sin perder sus propiedades. Se ha logrado demostrar que existen VHH con capacidad de atravesar la BHE, por lo que parecen ser una herramienta prometedora para el desarrollo de biomarcadores intracerebrales⁽¹⁷⁾.

En el año 2017 se realizó un estudio sobre el uso de los VHH en el análisis de la EA por resonancia magnética. Se utilizó el VHH conocido como R3VQ, el cual es capaz de atravesar la BHE y con especificidad por los depósitos de β -amiloide, lesiones características de la EA. Se utilizó *E. coli* para la expresión del R3VQ con una etiqueta 6-histidina en la región carbono terminal, lo cual permitió el reconocimiento de los depósitos de β -amiloide mediante técnicas inmunohistoquímicas en el modelo animal utilizado. También, se desarrollaron agentes de contraste para la detección de depósitos de β -amiloide mediante resonancia magnética en los modelos animales⁽¹⁷⁾.

En el 2016 se realizó un estudio sobre el posible uso de nAbs de un solo dominio de camélidos como una herramienta para la obtención de imágenes *in vivo* de dianas cerebrales intracelulares y extracelulares. Para ello, se utilizaron dos nuevos VHH capaces de reconocer específicamente los depósitos de los ovillos neurofibrilares de proteínas *tau* intracelulares y amiloides extracelulares. Se utilizaron ratones con lesiones por depósitos de proteína β -amiloide y se les administró VHH en la corteza frontal; posteriormente, se recolectaron muestras de tejido cerebral para el posterior análisis histológico⁽⁵⁾. Otros animales recibieron VHH conjugado con Alexa Fluor[®] y se realizaron los análisis correspondientes mediante microscopía confocal láser de barrido.

Los hallazgos obtenidos demuestran que VHH-E9 con un punto isoeléctrico básico atraviesa de manera pasiva la BHE, ingresa en el parénquima cerebral y se une a los astrocitos. En el estudio se concluyó que los VHH pueden ser utilizados como sondas específicas para dianas cerebrales localizadas a nivel intracelular y extracelular, lo que respalda su uso como una nueva herramienta de diagnóstico en Neurología⁽⁵⁾.

En el 2015 se estudió la inhibición de la actividad de la enzima β -secretasa (BACE1) mediada por los VHH. Se observó una menor producción y acumulación de la proteína β -amiloide, relacionado con la disminución del progreso de la EA. En un ensayo con células de neuroblastoma se evidenció el efecto inhibitorio de los VHH-B3 sobre la BACE1 y en un ensayo *in vivo*, el VHH-B3 disminuyó los niveles de β -amiloide en cerebro y plasma. Por esta razón, los VHH son considerados una estrategia terapéutica prometedora para disminuir la progresión de la EA, además, podrían ser utilizados para ayudar a comprender mejor el papel de la BACE1 en la EA⁽¹⁸⁾.

La administración de VHH anti-BACE1 mediante virus adenoasociados (AAV) demostró en un estudio preclínico realizado en ratones con la EA, que se podía disminuir la cantidad de β -amiloide. Los VHH suelen tener una difusión limitada a través de la BHE porque se eliminan rápidamente del parénquima, por lo que se utilizó AAV como vector para dirigir la entrega al sistema nervioso central (SNC). En un modelo animal de ratón con amiloidosis cerebral se observó una disminución importante en los niveles de β -amiloide después de la administración de una dosis única de VHH-B9 en el SNC. Con esto, se demostró la posibilidad de combinar los VHH con vectores virales para dirigirse a una proteína diana localizada en el SNC⁽¹⁹⁾.

Parkinson

Se considera la enfermedad de Parkinson como la segunda causa de neurodegeneración crónica progresiva, relacionada con un declive o empeoramiento de las neuronas dopaminérgicas encontradas en la sustancia negra pars compacta. Como consecuencia, los pacientes sufren de síntomas como temblores en reposo, postura inestable, afectación gastrointestinal, afectación del sueño, y alteraciones cognitivas y bradicinesia, que se presentan ante un grado importante de degeneración neuronal. Por lo general, el inicio y detección de la enfermedad se da alrededor de los 60 años, pero puede afectar a pacientes más jóvenes^(46, 47, 48, 49).

El declive neuronal puede estar asociado a una disfunción mitocondrial o a la agregación de la proteína α -sinucleína (α -Syn)⁽⁵⁰⁾, la cual tiene un papel importante en la liberación de neurotransmisores⁽⁵¹⁾.

Debido a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, se reduce la liberación de dopamina en el cuerpo estriado. Por esta razón, los circuitos neuronales en los ganglios basales se ven afectados, lo que deriva en una disminución de la función dopaminérgica y pérdida del control del movimiento⁽⁴⁸⁾.

En un estudio sobre la enfermedad de Parkinson, se evidenció que el nAbs bifuncional llamado VH14PEST es capaz de contrarrestar los efectos tóxicos de la α -Syn y posee efectos proteostáticos heterólogos⁽²⁰⁾. La α -Syn posee un componente no amiloide (NAC), que tiene una región de interacción hidrofóbica esencial para la agregación de esta proteína neuronal⁽⁵²⁾. En otro estudio se demostró la capacidad de los nAbs para reducir la toxicidad de la α -Syn al inhibir la formación de fibrillas, lo que provoca, mediante la unión del nAbs, una conversión conformacional de oligómeros de la α -Syn de alta estabilidad a una conformación menos estable. Ambos estudios sugieren el mismo resultado pero con mecanismos diferentes que podrían ser relevantes en términos terapéuticos⁽²¹⁾.

En otra investigación se utilizó un modelo animal basado en la sobreexpresión de la α -Syn donde se administraron dos nAbs orientados selectivamente a la proteína, con el fin de comparar su potencial terapéutico. Los nAbs utilizados fueron el VH14-PEST donde PEST es la región del NAC y el NbSyn87-PEST donde PEST es la región C terminal de la proteína. Se demostró que los dos nAbs poseían actividad contra la α -Syn y que el VH14-PEST era capaz de sostener el tono dopaminérgico⁽²²⁾.

Todo lo precedente hace referencia a estudios preclínicos, indispensables en la investigación del posible potencial terapéutico de las diferentes tecnologías con nAbs. Sin embargo, no se han encontrado publicaciones de estudios clínicos vigentes ni en periodo de revisión que permitan evidenciar el potencial terapéutico en humanos, o que promuevan el desarrollo de algún fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Diarrea

La diarrea se define como el aumento en la frecuencia de las deposiciones que puede llegar a ser de tres o más al día, además de cambios en la consistencia de las heces, que por lo general pasan a ser blandas o líquidas. Puede clasificarse según su duración como aguda, cuando se da por menos de 14 días, y persistente o crónica si sucede por encima de dos semanas⁽⁵³⁾. El exceso de contenido líquido en las heces es la característica más frecuente de diarrea crónica⁽⁵⁴⁾. Asimismo, se atribuye a la diarrea aguda distintas causas, entre las que se encuentran: infecciones por microorganismos o por intoxicación alimentaria, asociada a fármacos o sustancias tóxicas, intolerancia a alimentos, entre otros; además, cualquier causa de diarrea crónica puede manifestarse de manera aguda en las primeras semanas⁽⁵⁵⁾. Las diarreas se pueden agrupar con diferentes nombres de acuerdo a sus características, por lo que estas son de sumo cuidado y deben de ser vigiladas⁽⁵⁶⁾. Un ejemplo de esto, es la diarrea causada por *Rotavirus*, la cual puede ocasionar la muerte en menores de 5 años⁽⁵⁷⁾.

Actualmente, existen dos vacunas en el mercado contra *Rotavirus*; sin embargo, éstas no han mostrado los resultados esperados en las poblaciones más expuestas al virus, por lo que ha sido necesario el estudio de la enfermedad con el fin de desarrollar un tratamiento efectivo para la misma⁽⁵⁸⁾. Se ha estudiado el uso de nAbs en diarreas provocadas por *Rotavirus*, ya que estos poseen un sitio de reconocimiento de antígeno de una sola cadena. Esta es la principal razón por la que algunos animales como las vacas no se ven afectados por el virus, a pesar de la ingesta de agua contaminada⁽⁵⁹⁾.

A partir de este descubrimiento, se realizó una investigación en la cual se inmunizó una llama adulta con proteína VP6 derivada de una cepa de *Rotavirus* bovino. Se extrajo ADN de las células mononucleares y se amplificaron los fragmentos que codifican para VHH. Se seleccionaron dos clones de nAbs con amplia actividad neutralizante tanto *in vitro*, frente a cepas de *Rotavirus* animal y humano, como *in vivo* en ratones y se observó una reducción en la duración y severidad de la diarrea causada por el virus. Se concluyó que la administración de VHH anti-VP6 es una buena opción como tratamiento profiláctico, así como una opción terapéutica después de la aparición de los primeros síntomas⁽²³⁾.

Adicionalmente, un estudio realizado en ratones y cerdos gnotobióticos evidenció la importancia de los VHH en el diagnóstico de *Rotavirus* y su capacidad de neutralizar específicamente las cepas tipo A, lo que establece un antecedente para el desarrollo de un tratamiento terapéutico. Por esta razón, con el uso de VHH se patentó el kit diagnóstico Rotadial[®]. Asimismo, en el 2019 se patentó un biofár-

maco antiviral para el tratamiento de infecciones virales por *Rotavirus* en neonatos humanos; dicho tratamiento se utilizó previamente en terneros y mostró excelentes resultados en la neutralización del *Rotavirus* tipo A por VHH⁽²⁴⁾.

En otro estudio se ensayaron dos VHH utilizando un modelo animal. Mediante un test de ELISA, una titulación de infectividad viral y un cultivo celular de inmunofluorescencia, se demostró la unión de los VHH a la proteína VP6, lo que derivó en una protección parcial contra la diarrea severa y la reducción en la propagación del virus. Por esto, se ha considerado una buena opción para tratar la diarrea causada por el virus⁽²⁵⁾.

Actualmente no existe ninguna vacuna contra la diarrea causada por ETEC. Sin embargo, se ha demostrado la eficacia del uso de VHH para tratar enfermedades infecciosas en mucosas. Los VHH reconocen epítomos conservados en patógenos hipervariables, por lo que el uso de una combinación de éstos puede ser una buena opción e incluso más accesible económicamente que los anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, pueden ser utilizados en el desarrollo de una vacuna contra esta bacteria en ingeniería inversa⁽²⁶⁾.

COVID-19

La COVID-19 es una enfermedad causada por el Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)⁽⁶⁰⁾. Debido a su alta transmisibilidad, se declaró pandemia a inicios del 2020, lo que desencadenó una cantidad importante de estudios e investigaciones⁽⁶¹⁾. La infección puede ser asintomática o pueden presentarse cuadros clínicos leves o moderados e inclusive graves como el síndrome de distrés respiratorio agudo y shock séptico. La variedad de síntomas junto con la facilidad de mutación, han sido un gran reto para desarrollar una vacuna efectiva y un tratamiento que permita reducir los cuadros graves del virus⁽⁶²⁾.

El SARS-CoV-2 ingresa en la célula huésped mediante una interacción entre la glicoproteína de la espícula y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2). Por esta razón, con la intención de prevenir esta interacción, se aisló y caracterizó un fragmento de VHH de alta especificidad con un dominio globular presente en la superficie distal de la espícula del virus, evitando de esta forma su unión directa con la ECA2. Adicionalmente, este VHH puede expresarse en grandes cantidades en bacterias, por lo que representa una buena opción para su desarrollo a gran escala para la intervención de la COVID-19⁽⁹⁾.

Los nAbs se presentan como una futura opción prometedora para combatir la COVID-19; es por ello que diferentes laboratorios han desarrollado la primera biblioteca de VHH contra COVID-19, lo que permite a su vez la selección de anticuerpos capaces de neutralizar la infección viral; además, facilita la obtención de anticuerpos monoclonales que permiten la identificación del virus. Estos nAbs podrían funcionar como fármacos preventivos o terapéuticos complementarios a la vacunación⁽²⁷⁾.

Se han desarrollado medicamentos con nAbs que están en fase preclínica o clínica. En octubre del 2020, 13 fármacos se encontraban en fase I/II de estudios clínicos, dos medicamentos estaban en fase II/III y otros dos en fase III. Estas investigaciones representan un futuro prometedor para la utilización de Abs contra esta enfermedad. Por ejemplo, en 2020, se realizó un estudio en un modelo animal donde se evaluaron dos nAbs con alta afinidad a la proteína S del SARS-CoV-2. Se concluyó que, al administrar una mezcla de nAbs, es posible atacar diferentes sitios de unión de la proteína y lograr la neutralización de diversas variantes del virus. Cabe destacar que este estudio inició su primera fase clínica en junio del mismo año, esperando tener pronto resultados alentadores⁽²⁸⁾.

Además, otro estudio muestra cómo el administrar una forma inactiva del virus a camellos, desencadena una respuesta inmune favorable contra los componentes del virus, de manera que se produce una IgG específica presente en el suero y la leche de estos animales. Por esta razón, se cree que la utilización de estos nAbs puede producir una respuesta selectiva capaz de inhibir y neutralizar al virus, también se espera que con el consumo de la leche de estos animales se genere una respuesta inmunitaria pasiva como profilaxis para prevenir un cuadro grave. Por otro lado, se indica que los pacientes infectados podrían ingerir la leche tres veces al día para neutralizar el virus⁽²⁹⁾.

Por último, cabe destacar que el uso de VHH se presenta como una potencial alternativa en el tratamiento empírico de la COVID-19. Se han seleccionado tres VHH que muestran en estudios *in vitro* una capacidad de neutralización viral cercana al 50%. Se concluye, por tanto, que pueden ser utilizados en profilaxis y como tratamiento empírico, reduciendo las complicaciones, elevando la tasa de supervivencia de pacientes⁽³⁰⁾.

Conclusiones

Debido a la alta especificidad, tamaño pequeño y otras características favorables de los nAbs, se ha evaluado su uso en enfermedades como cáncer, hepatitis, Alzheimer, Parkinson, diarrea y COVID-19. Los estudios consultados indican que los nAbs son una herramienta prometedora para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, es de suma importancia continuar con el desarrollo de estudios clínicos que evidencien la eficacia y seguridad de los nAbs.

Bibliografía

1. Hameed A. Conventional and Nano-Antibodies and Their Future Uses. *AAJMS*. 2019;2(3):14-34.
2. Langjahr P, Sotelo P. Presente y futuro de los anticuerpos recombinantes terapéuticos. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2016;14(2):110-21.
3. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Antigen Recognition in the Adaptive Immune System: Structure of Lymphocyte Antigen Receptors and Development of Immune Repertoires. En: *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* [Internet]. 6ª ed. 2020. Disponible en: <https://www-clinicalkey-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/#!/content/book/3-s2.0-B9780323549431000040?scroll-To=%23hl0000384>
4. Wong A, Sykora C, Rogers L, Higginbotham J, Wang J. Modified Nanoantibodies Increase Sensitivity in Avidin-Biotin Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(9):682-8.
5. Li T, Vandesquille M, Koukoui F, et al. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for *in vivo* imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J Control Release*. 2016;243:1-10.
6. Liu W, Song H, Chen Q, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol*. 2018;96:37-47.
7. Vázquez V. Análisis transcriptómico y desarrollo de una biblioteca de los genes codificantes para anticuerpos IgNAR del tiburón *Heterodontus francisci*. Baja California, México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada; 2018.
8. English H, Hong J, Ho M. Ancient species offers contemporary therapeutics: an update on shark VNAR single domain antibody sequences, phage libraries and potential clinical applications. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa001>.
9. Pedreñe A, Mosquera J, Muñoz N, Tene D. Nanoanticuerpos: pequeñas moléculas, grandes posibilidades. *Act Biocl*. 2021;11(22):296-319.
10. Parreno G, Vega C, Bok M, Adúriz M, Aguilar A. Nanoanticuerpos derivados de llamas: una alternativa innovadora para controlar las diarreas por rotavirus y norovirus humano. *Revista Ciencia Reguladora de la ANMAT*. 2019;26-30.
11. Li C, Tang Z, Hu Z, et al. Natural Single-Domain Antibody-Nanobody: A Novel Concept in the Antibody Field. *J Biomed Nanotechnol*. 2018;14(1):1-19.
12. Chen J, He Q, Xu Y, et al. Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Talanta*. 2016;147:523-30. Doi: 10.1016/j.talanta.2015.10.027.
13. Van Impe K, Bethuyn J, Cool S, et al. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*. 2013;15(6):R116. Doi: 10.1186/bcr3585.

14. Heukers R, Fan TS, Wit RH de, et al. The constitutive activity of the virally encoded chemokine receptor US28 accelerates glioblastoma growth. *Oncog Res.* 2018;30(1):1-12. Doi: 10.1038/s41388-018-0255-7.
15. Henan Cancer Hospital. Clinical Study of CD19/CD20 Bispecific Nanobody-derived CAR-T Cells in Refractory/Relapsed B Cell Lymphoma [Internet]. *clinicaltrials.gov*. 2019. Report No.: NCT03881761.
16. Jittavisutthikul S, Thanongsaksrikul J, Thueng-In K, et al. Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication. *Viruses.* 2015;7(4):2030-56. Doi: 10.3390/v7042030.
17. Vandesquille M, Li T, Po C, et al. Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *mAbs.* 2017;9(6):1016-27.
18. Dorresteijn B, Rotman M, Faber D, et al. Camelid heavy chain only antibody fragment domain against β -site of amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibits β -secretase activity *in vitro* and *in vivo*. *FEBS J.* 2015;282(18):3618-31.
19. Rincon M, Zhou L, Marneffe C, et al. AAV mediated delivery of a novel anti-BACE1 VHH reduces Abeta in an Alzheimer's disease mouse model [Preprint]. Leuven: bioRxiv; 2019.
20. Butler DC, Joshi SN, Genst ED, Baghel AS, Dobson CM, Messer A. Bifunctional Anti-Non-Amyloid Component α -Synuclein Nanobodies Are Protective In Situ. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165964. Doi: 10.1371/journal.pone.0165964.
21. Iljina M, Hong L, Horrocks MH, et al. Nanobodies raised against monomeric α -synuclein inhibit fibril formation and destabilize toxic oligomeric species. *BMC Biol.* 2017;15:57. Doi: 10.1186/s12915-017-0390-6.
22. Chatterjee D, Bhatt M, Butler D, et al. Proteasome-targeted nanobodies alleviate pathology and functional decline in an α -synuclein-based Parkinson's disease model. *Npj Park Di.* 2018;4(1):1-10. Doi: 10.1038/s41531-018-0062-4.
23. Maffey L. Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6 [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; 2016.
24. Mendez, M. Vinculación, transferencia y utilidad social de los conocimientos : el caso de INCUINTA (2004-2019) [Tesis de grado]. Universidad Nacional de La Plata: Memoria Académica; 2021.
25. Crowell L, Goodwine C, Holt C, et al. Development of a platform process for the production and purification of single-domain antibodies. *Biotechnol Bioeng.* 2021;118(9):3348-3358. Doi: 10.1002/bit.27724.
26. Amcheslavsky A, Wallace A, Ejemel M, et al. Anti-CfaE nanobodies provide broad cross-protection against major pathogenic enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, with implications for vaccine design. *Sci Rep.* 2021;11(1):2751. Doi: 10.1038/s41598-021-81895-0.
27. Esperbent, C. Construyen una biblioteca de nanoanticuerpos de llamas contra la COVID-19. *Rev investig agropecu.* 2020;46(2):145-7.
28. Zhou Z, Wang X, Zhang X, et al. Significance of neutralizing antibodies in COVID-19 therapy: progress and prospect. *J Chin Pharm Sci.* 2021;30(2):87-106. Doi: 10.5246/jcps.2021.02.008.
29. Hasson S, Al-Jabri A. Immunized camels and COVID-19. *Asian Pac J Trop Med.* 2020;13(6):239-241. Doi: 10.4103/1995-7645.282561.
30. Djemli S, Tahraoui A, Boussena M, et al. Camelid Antibodies May well be effective Against SARS-CoV-2 variants. 2021;6(6):604-606.
31. Sánchez C. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Rev méd Clín Las Condes.* 2013;24(4):553-62. Doi: 10.1016/S0716-8640(13)70659-X.
32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
33. Mitrus I, Bryndza E, Sochanik A, Szala S. Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biol.* 2012;33(4):911-7. Doi: 10.1007/s13277-012-0389-0.

34. Van Audenhove I, Gettemans J. Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. *EBioMedicine*. 2016;8:40-8. Doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.028.
35. Nikooharf A, Arezumand R, Mansouri K, Khoshi AH, Namdar Ahmadabad H. Development of a Recombinant Monospecific Anti-PLGF Bivalent Nanobody and Evaluation of it in Angiogenesis Modulation. *Mol Biotechnol*. 2020;62(11-12):580-8. Doi: 10.1007/s12033-020-00275-7.
36. Jiménez A. Virtual biopsy: seeing invisible cancer. *SEBBM*. 2018. Doi: 10.18567/sebbmdiv_ANC.2018.01.1.
37. Arezumand R, Alibakhshi A, Ranjbari J, Ramazani A, Muyldermans S. Nanobodies As Novel Agents for Targeting Angiogenesis in Solid Cancers. *Front Immunol*. 2017;0. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01746.
38. Verhaar ER, Woodham AW, Ploegh HL. Nanobodies in cancer. *Semin Immunol*. 2020;101425. Doi: 10.1016/j.smim.2020.101425.
39. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006;1(1):23-61. Doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230.
40. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1118-29. Doi: 10.1056/NEJMra031087.
41. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl 1:S36-42. Doi: 10.1016/s0168-8278(03)00137-5.
42. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):96-102. Doi: 10.1016/j.tim.2003.12.005.
43. Rius S, Tormos AM, Pérez S, Taléns R. Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease?. *Neurol Engl Ed*. 2018;33(2):112-20. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.07.008>.
44. Apostolova L. Alzheimer Disease. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2016;22(2):419-34. doi: 10.1212/CON.0000000000000307.
45. Asefy Z, Hoseinejhad S, Ceferov Z. Nanoparticles approaches in neurodegenerative diseases diagnosis and treatment. *Neurol Sci*. 2021;42(7):2653-60. doi: 10.1007/s10072-021-05234-x.
46. Marín M, Carmona V, Ibarra Q, et al. Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Rev Univ Ind Santander Salud*. 2018;50(1):79-92. Doi: 10.18273/revsal.v50n1-2018008.
47. Vázquez GE, Zoghbi HY. Parkinson's Disease Genetics and Pathophysiology. *Annu Rev Neurosci*. 2021;44(1):87-108. Doi: 10.1146/annurev-neuro-100720-034518.
48. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management. *Pharm Ther*. 2015;40(8):504-32.
49. de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):525-35. Doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
50. Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. 2016;90(4):675-91. Doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038.
51. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton M, Südhof T. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly *in Vivo* and *in Vitro*. *Science*. 2010; 329(5999):1663-7. doi: 10.1126/science.1195227.
52. Giasson BI, Murray IVJ, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2380-6. Doi: 10.1074/jbc.M008919200.
53. Múñez E, Pintos I, Ramos A. Protocolo diagnóstico y tratamiento de la diarrea en el paciente inmunocomprometido. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2018;12(55):3285-3288. Doi: 10.1016/j.med.2018.04.017.
54. Barraca J. Protocolo diagnóstico de la diarrea crónica. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2016;12(4):197-202. Doi: 10.1016/j.med.2016.02.013.

- 55.** Arco R, Lázaro J, Díaz P. Protocolo diagnóstico y terapéutico de la diarrea aguda. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2019;12(87):5135-9. Doi: 10.1016/j.med.2019.10.007.
- 56.** Escribano L, Rodríguez A, Centeno G. Protocolo diagnóstico etiopatogénico de la diarrea crónica. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2020;13(1):38-44. Doi: 10.1016/j.med.2020.01.005.
- 57.** Fei P, Chen J, Jiang Y, et al. Rotavirus-Induced Diarrhea Changes the Proteins, Amino Acids and Fatty Acids Profiles in Fecal Samples of the Infants. *Iran J Pediatr*. 2021;31(1). Doi: 10.5812/ijp.100031.
- 58.** Maffey L, Vega CG, Parreño V, Garaicoechea L. Controlling Rotavirus-associated diarrhea: Could single-domain antibody fragments make the difference? *Rev Argent Microbiol*. 2015;47(4):368-79. Doi: 10.1016/j.ram.2015.09.005.
- 59.** Fernandes C, Pereira S, Luiz M, Zuliani J, Furtado G, Stabeli R. Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:653. Doi: 10.3389/fimmu.2017.00653.
- 60.** Pérez M, Gómez J, Dieguez R. Características clínico-epidemiológicas de la COVID-19. *Rev habanera cienc médi*. 2020;19 (2):1-15.
- 61.** Serra M. COVID-19. De la patogenia a la elevada mortalidad en el adulto mayor y con comorbilidades. *Rev habanera cienc médi*. 2021;19(3).
- 62.** Avila J. Coronavirus COVID-19; patogenia, prevención y tratamiento. 4ªed. Lejona: salusplay; 2020. 19-25 p.

Anexo: Abreviaturas

Abs	Anticuerpos
α-Syn	Proteína alfa-sinucleína
AAV	Virus adenoasociados
AFP	Alfa-fetoproteína
Anti-VP6	Anticuerpos contra la proteína VP6
BACE1	Enzima que escinde la proteína precursora amiloide
BHE	Barrera hematoencefálica
CapG	Componente del citoesqueleto de actina
CAPNb2	Nanoanticuerpos disponibles para dianas de tumores en ratones
CD19 y CD20	Nanoanticuerpos biespecíficos en el linfoma de células B
CDR	Regiones de determinación complementaria
Células CAR-T	Células T con receptores quiméricos de antígenos
EA	Enfermedad de Alzheimer
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GMB	Glioblastomas
Ig	Inmunoglobulinas
IgNAR	Nanoanticuerpos de cadena pesada

nAbs	Nanoanticuerpos
NAC	Componente no amiloide
NbSyn87-PEST	Nanoanticuerpo bifuncional donde PEST es la región C terminal de la proteína
R3VQ	Virus VHH con capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo
SNC	Sistema nervioso central
US28	Receptor de quimiocinas
VH14-PEST	Nanoanticuerpo bifuncional donde PEST es la región del componente no amiloide
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHH	Nanoanticuerpos de dominio simple derivado de camélidos

© BY-NC-SA 4.0