

Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica / Alicia Abril; Javier Tascón; Laura Vicente-Vicente; Alfredo G. Casanova; Marta Prieto; Ana I. Morales / Diseño y desarrollo de una crema pañal con leche de burra / Beatriz Bautista Sánchez; Aránzazu Zarzuelo Castañeda / Valoración de la incidencia de prm/rnm en pacientes tratados con anticoagulantes orales y evaluación de la intervención farmacéutica en farmacia comunitaria / Laura María Martínez De Morentin De Benito; Carlos Treceño Lobato; Elena Valles Martín / Avances en el desarrollo de nuevas vacunas contra *Fasciola hepatica* / Darío Perallón Mantas; Javier Sánchez Montejo; Antonio Muro Álvarez / Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas en la población / Ángela Pérez Sancho; Ramona Mateos Campos / Distribución de picaduras de garrapatas retiradas a personas durante la pandemia del COVID-19 en Castilla y León / Carlos Rivas; Carmen Vieira; Antonio Muro / Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica / Alicia Abril; Javier Tascón; Laura Vicente-Vicente; Alfredo G. Casanova; Marta Prieto; Ana I. Morales / Diseño y desarrollo de una crema pañal con leche de burra / Beatriz Bautista Sánchez; Aránzazu Zarzuelo Castañeda / Valoración de la incidencia de prm/rnm en pacientes tratados con anticoagulantes orales y evaluación de la intervención farmacéutica en farmacia comunitaria / Laura María Martínez De Morentin De Benito; Carlos Treceño Lobato; Elena Valles Martín / Avances en el desarrollo de nuevas vacunas contra *Fasciola hepatica* / Darío Perallón Mantas; Javier Sánchez Montejo; Antonio Muro Álvarez / Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas en la población / Ángela Pérez Sancho; Ramona Mateos Campos / Distribución de picaduras de garrapatas retiradas a personas durante la pandemia del COVID-19 en Castilla y León / Carlos Rivas; Carmen Vieira; Antonio Muro / Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica / Alicia Abril; Javier Tascón; Laura Vicente-Vicente; Alfredo G. Casanova; Marta Prieto; Ana I. Morales / Diseño y desarrollo de una crema pañal con leche de burra / Beatriz Bautista Sánchez; Aránzazu Zarzuelo Castañeda / Valoración de la incidencia de prm/rnm en pacientes tratados con anticoagulantes orales y evaluación de la intervención farmacéutica en farmacia comunitaria / Laura María Martínez De Morentin De Benito; Carlos Treceño Lobato; Elena Valles Martín / Avances en el desarrollo de nuevas vacunas contra *Fasciola hepatica* / Darío Perallón Mantas; Javier Sánchez Montejo; Antonio Muro Álvarez / Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas en la población / Ángela Pérez Sancho; Ramona Mateos Campos / Distribución de picaduras de garrapatas retiradas a personas durante la pandemia del COVID-19 en Castilla y León / Carlos Rivas; Carmen Vieira; Antonio Muro / Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica / Alicia Abril; Javier Tascón; Laura Vicente-Vicente; Alfredo G. Casanova; Marta Prieto; Ana I. Morales / Diseño y desarrollo de una crema pañal con leche de burra / Beatriz Bautista Sánchez; Aránzazu Zarzuelo Castañeda / Valoración de la incidencia de prm/rnm en pacientes tratados con anticoagulantes orales y evaluación de la intervención farmacéutica en farmacia comunitaria / Laura María Martínez De Morentin De Benito; Carlos Treceño Lobato; Elena Valles Martín / Avances en el desarrollo de nuevas vacunas contra *Fasciola hepatica* / Darío Perallón Mantas; Javier Sánchez Montejo; Antonio Muro Álvarez / Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas en la población / Ángela Pérez Sancho; Ramona Mateos Campos / Distribución de picaduras de garrapatas retiradas a personas durante la pandemia del COVID-19 en Castilla y León / Carlos Rivas; Carmen Vieira; Antonio Muro / Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica / Alicia Abril; Javier Tascón;



EDICIONES UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DIRECCIÓN: Marta PRIETO VICENTE, Universidad de Salamanca, Spain

COMITÉ EDITORIAL: Antonio MURO ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain
Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain
Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain
Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ, Universidad de Salamanca, Spain

AYUDANTE DE DIRECCIÓN: Javier TASCÓN ROMERO, Universidad de Salamanca, Spain

COMITÉ CIENTÍFICO: Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain
Antonio MURO ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain
Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain
Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ, Universidad de Salamanca, Spain

CORRECTOR DE ORIGINALES: María Eloísa REVILLA LÓPEZ, Spain

SECRETARÍA DE REDACCIÓN: Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca
Campus Miguel de Unamuno, s/n - 37008 Salamanca, España

El comité científico de *FarmaJournal* quiere agradecer la colaboración durante el proceso de revisión de los artículos de investigación publicados en este número a los siguientes profesores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca:

María Ángeles Almeida Parra, María Encarnación Aparicio López, Antonio Blázquez Zaballos, Óscar Briz Sánchez, Manuel Fuentes García, Laura Gallego Yerga, José Ángel García Pedraza, Eliseo Herrero Hernández, Marta Lumbreras Martín, José Luis Pérez Pavón, Javier Robles Valero, Adela María Sánchez Ávila, Raquel Trujillano Hernández, María Belén Vicente Santiago, Hinojal Zazo Gómez.

FARMAJOURNAL es una revista científica en español sobre farmacología, de periodicidad semestral y en la que los artículos recibidos son evaluados por revisores y posteriormente aprobados por un tribunal docente. Los trabajos publicados pueden consultarse en: «eUSAL Revistas» <<https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355>>, Gredos <<https://gredos.usal.es/handle/10366/127837>>, Dialnet.

REALIZA: INTERGRAF

ÍNDICE

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Alicia ABRIL; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Marta PRIETO; Ana I. MORALES, Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica.....	7-19
Beatriz BAUTISTA SÁNCHEZ; Aránzazu ZARZUELO CASTAÑEDA, Diseño y desarrollo de una crema pañal con leche de burra.....	21-31
Laura María MARTÍNEZ DE MORENTIN DE BENITO; Carlos TRECEÑO LOBATO; Elena VALLES MARTÍN, Valoración de la incidencia de prn/rnm en pacientes tratados con anticoagulantes orales y evaluación de la intervención farmacéutica en farmacia comunitaria.....	33-47
Darío PERALLÓN MANTAS; Javier SÁNCHEZ MONTEJO; Antonio MURO ÁLVAREZ, Avances en el desarrollo de nuevas vacunas contra <i>Fasciola hepatica</i>	49-57
Ángela PÉREZ SANCHO; Ramona MATEOS CAMPOS, Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas en la población.....	59-73
Carlos RIVAS; Carmen VIEIRA; Antonio MURO, Distribución de picaduras de garrapatas retiradas a personas durante la pandemia del COVID-19 en Castilla y León.....	75-84

INDEX

RESEARCH REPORTS

Alicia ABRIL; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Marta PRIETO; Ana I. MORALES, Characterization of Renal Damage Associated with Oncologic Immunotherapy	7-19
Beatriz BAUTISTA SÁNCHEZ; Aránzazu ZARZUELO CASTAÑEDA, Design and Development of a Diaper Cream with Donkey Milk	21-31
Laura María MARTÍNEZ DE MORENTIN DE BENITO; Carlos TRECEÑO LOBATO; Elena VALLES MARTÍN, Assessment of the Incidence of DRP/NOM in Patients Treated with Oral Anticoagulants and Evaluation of Pharmaceutical Intervention in Community Pharmacy	33-47
Darío PERALLÓN MANTAS; Javier SÁNCHEZ MONTEJO; Antonio MURO ÁLVAREZ, Advances in the Development of New Vaccines against <i>Fasciola hepatica</i>	49-57
Ángela PÉREZ SANCHO; Ramona MATEOS CAMPOS, Evaluation of Knowledge, Attitudes and Behaviours about Vaccines in the Population	59-73
Carlos RIVAS; Carmen VIEIRA; Antonio MURO, Distribution of Tick Bites Removed from People during the COVID-19 Pandemic in Castilla y León	75-84

**Artículos
de investigación**

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL DAÑO RENAL ASOCIADO A LA INMUNOTERAPIA ONCOLÓGICA

Characterization of Renal Damage Associated with Oncologic Immunotherapy

Alicia ABRIL; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Marta PRIETO; Ana I. MORALES*.

Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Edificio Departamental. Laboratorios 223-226. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

*Correo-e: amorales@usal.es

RESUMEN: Los inhibidores del punto de control inmunitario (IPCI) son un grupo farmacológico destacable dentro de la inmunoterapia oncológica. Los IPCI se administran en monoterapia o en terapia combinada junto a quimioterápicos como el cisplatino, mostrando excelentes resultados clínicos. Sin embargo, no están exentos de reacciones adversas como la lesión renal inducida por IPCI, mínimamente estudiada y que empeora el pronóstico del paciente.

El objetivo del estudio fue la caracterización funcional del daño renal asociado a los IPCI (anti-CTLA-4 y anti-PD-1) y a la combinación de estos con cisplatino, mediante una batería de biomarcadores de lesión renal. En el estudio, se emplearon ratones macho C57BL/6 divididos en grupos experimentales. Cada grupo recibió, correspondientemente: anti-PD-1, anti-CTLA-4, cisplatino o la terapia combinada de cisplatino+anti-CTLA-4+anti-PD-1. El análisis de biomarcadores se realizó mediante técnicas colorimétricas y de inmunoensayo. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico empleando el programa IBM SPSS® Statistics.

Los biomarcadores plasmáticos (creatinina y urea) no mostraron lesión renal en ningún grupo de tratamiento, mientras que los biomarcadores

urinarios (NGAL, KIM-1 y albúmina) aumentaron en los grupos de terapia combinada mostrando daño renal subclínico. Por ello, los biomarcadores urinarios podrían resultar ventajosos en el diagnóstico precoz del daño renal asociado a IPCI en pacientes oncológicos.

Palabras clave: inhibidores del punto de control inmunitario (IPCI); cisplatino; terapia combinada; daño renal; biomarcadores de daño renal subclínico.

ABSTRACT: Immune checkpoint inhibitors (IPCI) are a remarkable pharmacological group on cancer immunotherapy. IPCI are administered in monotherapy or in combination therapy with chemotherapeutics such as cisplatin, showing excellent clinical results. However, they are not exempt from adverse reactions such as IPCI-induced renal injury, which has been minimally studied and worsens the patient's prognosis.

The aim of the study was the functional characterization of renal damage associated with IPCI (anti-CTLA-4 and anti-PD-1), and their combination with cisplatin, by means of a battery of renal injury biomarkers. In the study, male C57BL/6 mice were divided into experimental groups. Each group received correspondingly; anti-PD-1, anti-CTLA-4, cisplatin, or the combined therapy of cisplatin+anti-CTLA-4+anti-PD-1. Biomarker analysis was performed using colorimetric and immunoassay techniques. The data were subjected to statistical analysis using IBM SPSS® Statistics software.

Plasma biomarkers (creatinine and urea) did not show renal injury in any treatment group, whereas urinary biomarkers (NGAL, KIM-1 and albumin) increased in the combined therapy groups showing subclinical renal damage. Therefore, urinary biomarkers could be advantageous in the early diagnosis of renal damage associated with IPCI in oncology patients.

Keywords: immune checkpoint inhibitors (IPCI); cisplatin; combined therapy; renal damage; biomarkers of subclinical renal damage.

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento del cáncer ha experimentado una revolución durante los últimos años, gracias al mayor conocimiento de la respuesta inmune frente a los tumores y de los mecanismos de evasión de estos, así como a la necesidad de obtener terapias más eficaces y mejor toleradas por el paciente. Una de las terapias más novedosas, y con mejores resultados clínicos, es la inmunoterapia, cuyo grupo

farmacológico de mayor relevancia lo constituyen los “inhibidores del punto de control inmunitario” (IPCI) (Izzedine *et al.*, 2016).

Los IPCI son anticuerpos monoclonales, entre los que destacan anti-CTLA-4 y anti-PD-1 (Izzedine *et al.*, 2016). Fármacos dirigidos, respectivamente, frente a dos dianas moleculares presentes en la membrana de linfocitos T que constituyen un grupo de moléculas necesarias para asegurar la autotolerancia inmunitaria: el antígeno cuatro del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el receptor uno de muerte celular programada (PD-1). La administración de anti-CTLA-4 impide la transducción de una señal inhibitoria al linfocito T, estimulando su activación. Por otro lado, la administración de anti-PD-1 mantiene la activación de las células T y restablece su respuesta contra las células tumorales (Centanni *et al.*, 2019).

Algunos tumores son resistentes al tratamiento con anti-CTLA-4 y anti-PD-1, lo que ha motivado la administración de combinaciones de inmunoterápicos y quimioterápicos para aumentar la eficacia del tratamiento (Abdel-Rahman y Fouad, 2016). Dicha terapia combinada ha sido aprobada recientemente y uno de los quimioterápicos empleados es el cisplatino, fármaco citotóxico capaz de inhibir la síntesis del ADN (Sharp y Siskind, 2017).

Los IPCI motivan la pérdida de autotolerancia inmunitaria periférica, causando por ello la aparición de reacciones adversas (Hryniewicki *et al.*, 2018). La lesión renal inducida por IPCI es una reacción adversa mínimamente estudiada hasta ahora, cuya principal manifestación clínica es la nefritis tubulointersticial aguda (Izzedine *et al.*, 2016), lesión inflamatoria caracterizada por la aparición de insuficiencia renal aguda (IRA) con lesiones tubulares y glomerulares (Perazella y Shirali, 2020). La terapia combinada de inmunoterapia y quimioterapia aumenta el riesgo de sufrir efectos adversos (Flynn y Larkin, 2017).

El algoritmo diagnóstico seguido en clínica para detectar la IRA se basa en la utilización de dos biomarcadores clásicos no sensibles ni específicos, la creatinina plasmática (CrP) y la urea plasmática (UP) (Wu y Huang, 2017). Esto hace necesario emplear técnicas invasivas como la biopsia renal en el diagnóstico diferencial de la lesión renal inducida por IPCI (Hryniewicki *et al.*, 2018).

La detección precoz de la lesión renal inducida por IPCI permite revertir el daño tras la suspensión del tratamiento con estos o disminución de su dosis, junto a la administración de corticosteroides (Hryniewicki *et al.*, 2018). Los biomarcadores clásicamente empleados no permiten detectar la lesión renal precozmente. De ahí la necesidad de caracterizar el daño renal asociado a IPCI en los primeros estadios, mediante sistemas diagnósticos innovadores. Moléculas como la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la molécula de daño renal 1 (KIM-1) y albúmina aparecen en orina en las primeras fases del daño permitiendo la detección del daño renal subclínico (Vaidya *et al.*, 2008).

Actuar de forma temprana tras la aparición de una lesión renal podría impedir la suspensión del tratamiento antitumoral, lo que supondría un punto de inflexión en la supervivencia del paciente (Izzedine *et al.*, 2016). La posibilidad de emplear biomarcadores de IRA más sensibles y específicos permitiría prevenir el desarrollo de la lesión renal y una evaluación de la situación clínica del paciente más precisa.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis planteada es que el daño renal causado por IPCI pudiera ser subclínico y no evidenciado por los parámetros empleados en clínica. Además, la asociación de quimioterapia e inmunoterapia podría conducir a un aumento de los efectos nefrotóxicos. Con base en esto, los objetivos del trabajo son:

- Desarrollo de un modelo experimental para caracterizar el daño renal asociado a los IPCI administrados en monoterapia y combinados con quimioterapia.
- Estudio funcional del daño renal asociado a los IPCI y a la combinación con quimioterapia mediante una batería de biomarcadores de lesión renal.

3. METODOLOGÍA

3.1. *Diseño experimental*

Se emplearon ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de vida que se distribuyeron en grupos experimentales de forma homogénea en cuanto a peso se refiere y se mantuvieron bajo condiciones controladas en el Animalario de la Universidad de Salamanca, con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. Los experimentos de cisplatino y de terapia combinada se llevaron a cabo durante 6 días. Los IPCI en monoterapia se administraron durante 9 días. Se realizaron muestreos de orina y sangre en los días indicados en el cronograma (Figura 1).

3.2. *Análisis de biomarcadores*

La función renal de cada ratón se evaluó mediante la medida de las concentraciones plasmáticas de CrP y UP y las concentraciones urinarias de KIM-1, NGAL y albúmina (muestras de días 0, 3 y 6). Los resultados correspondientes al día 9 se excluyeron por no ser relevantes en los objetivos propuestos.

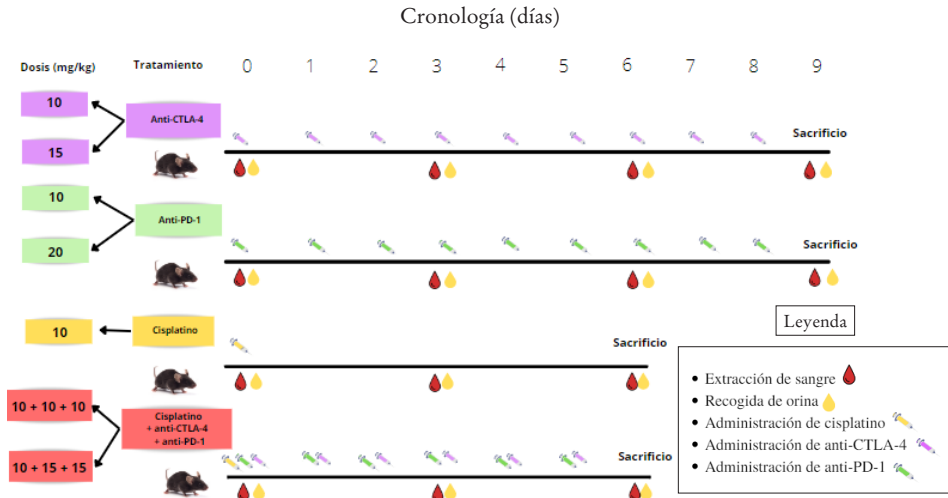


Figura 1. Cronograma de los experimentos. El cisplatino se administró en dosis única a día 0 del experimento. Los fármacos anti-CTLA-4 y anti-PD-1 se administraron con pauta diaria. Las administraciones se realizaron por vía intraperitoneal. La orina correspondiente a 24 horas se recogió en los colectores de jaulas metabólicas (en las que se introdujo a los animales 48 horas antes de la recogida para su acostumbramiento) y se almacenó a 4 °C para su posterior procesamiento. La extracción de sangre a día 0 y día 3 (y día 6 en el caso de IPCI administrados en monoterapia) se realizó a través de la vena submandibular previa anestesia de los ratones con isoflurano (extracción de alrededor de 0,15 mL). Previo al sacrificio, se administró como anestésico pentobarbital (100 mg/kg) y se realizó un corte en V en el abdomen para extraer sangre a punto final por incisión en el corazón (entre 0,5-1 mL). Cada muestra de sangre obtenida se almacenó a 4 °C en un Eppendorf con AEDT 0,5M como anticoagulante para su posterior procesamiento. Cada muestra de sangre se centrifugó (7000 giros durante 4 minutos) para obtener el plasma. El plasma se transfirió a otro Eppendorf mediante una micropipeta.

3.2.1. Técnicas colorimétricas

Empleadas en la determinación de CrP y UP. En la determinación de creatinina se empleó el kit QuantiChrom®DICT-500 y en el de urea el kit de Biochain®Z5030016. El fundamento teórico de estas determinaciones se basa en la capacidad de CrP o UP para reaccionar específicamente con picrato o un agente cromogénico (respectivamente), formando un complejo coloreado. Se midió la absorbancia del complejo formado en las muestras mediante un espectrofotómetro, a 510 nm en el caso de creatinina y 520 nm en urea. A partir de la absorbancia obtenida se calcularon las concentraciones de biomarcador, interpolando en una recta patrón diseñada con estándares de concentraciones conocidas del biomarcador a determinar.

3.2.2. Técnicas de inmunoensayo

En la determinación de biomarcadores urinarios (NGAL, KIM-1 y albúmina) se empleó la técnica inmunoenzimática ELISA tipo sándwich, cuyo fundamento teórico se basa en la capacidad de un anticuerpo fijado en una placa para reaccionar de forma específica con NGAL, KIM-1 o albúmina. Tras pasos sucesivos, se adiciona un anticuerpo monoclonal biotinilado que contiene la enzima peroxidasa de rábano capaz de catalizar la conversión de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un agente cromogénico azul. Posteriormente, se adiciona ácido sulfúrico para parar la reacción. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de biomarcador en la muestra biológica. Por lo que las concentraciones se calcularon midiendo la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro e interpolando en una recta patrón. En la determinación de NGAL se empleó el kit ELISA BioPorto-Diagnostics®042, en la de KIM-1 el kit ELISA ReddotBiotechInc.®RD-Kim1-Mu y en la de albúmina el kit ELISA BethylLaboratories® E99-134.

3.3. Análisis estadístico

Se empleó el programa IBM SPSS® Statistics versión 20, IBM, Armonk, NY, EE. UU. Se realizó una prueba de normalidad (test de Shapiro-Wilk). A los valores que seguían una distribución normal se les aplicó el test ANOVA de una vía y como prueba Post-hoc, el test de Scheffe. Los valores con distribución no normal se sometieron a un análisis de pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis). Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas si p-valor < 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

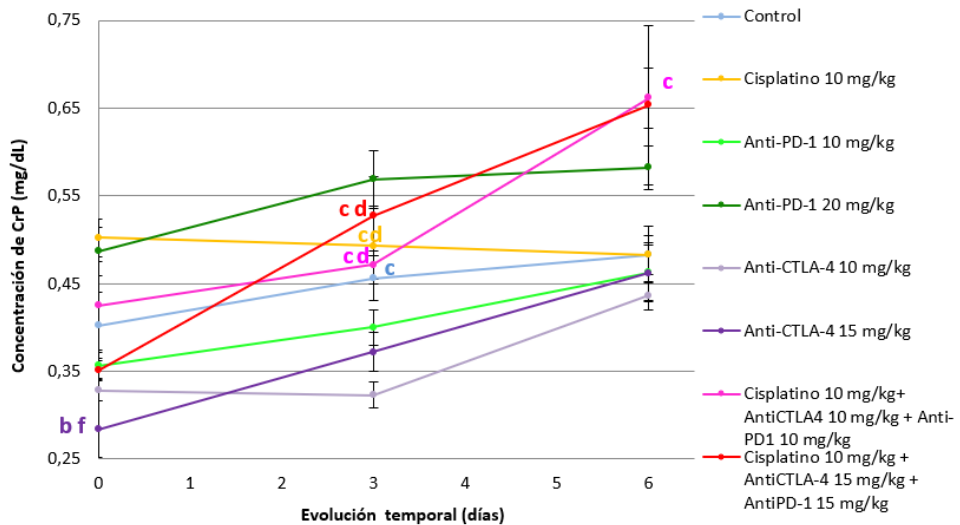
4.1. Biomarcadores plasmáticos: Creatinina (CrP) y Urea (UP)

Las concentraciones de CrP (Figura 2A) y UP (Figura 2B) a día 0 y día 3 se situaron dentro del rango de normalidad en ratón (0,42-0,58 mg/dL y 62,48-77,46 mg/dL respectivamente) (Quimby y Luong, 2007). Las diferencias observadas entre grupos pudieron estar causadas por la idiosincrasia de cada ratón y que los experimentos no se realizaron de forma sincrónica (no se dispone de jaulas metabólicas suficientes para incluir todos los ratones en un experimento).

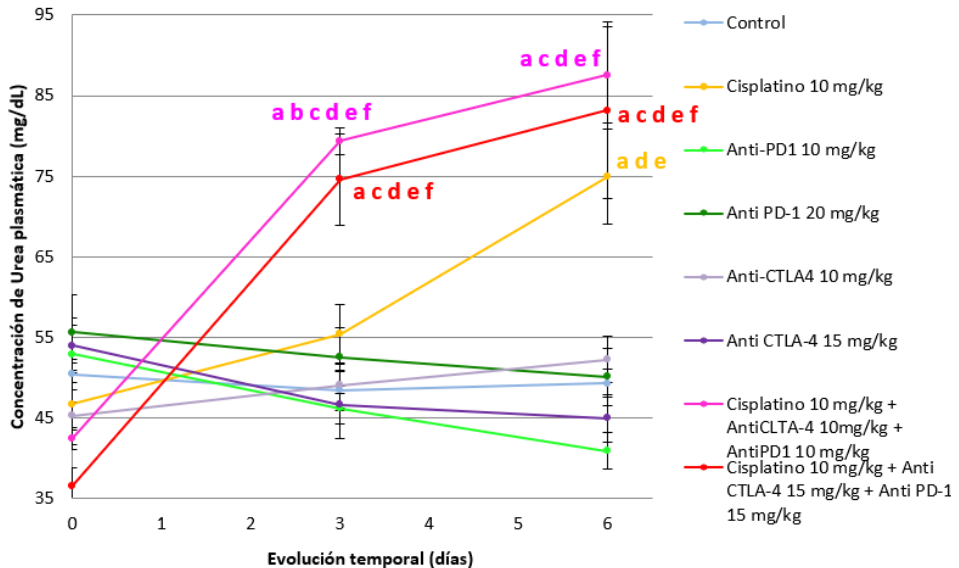
A día 6 ambos biomarcadores aumentaron ligeramente por encima del rango de normalidad (Quimby y Luong, 2007) en los grupos de terapia combinada. Este incremento pudo evidenciar un deterioro de la filtración glomerular (Wu y Huang, 2018). Sin embargo, debido a que estos parámetros dependen de numerosos factores extrarrenales y varían de forma fisiológica (Bagshaw y Bellomo, 2007), este ligero aumento no fue suficiente para dilucidar la existencia de daño renal.

El hecho de que las concentraciones de UP aumentasen a día 6 en el grupo de cisplatino podría sugerir que UP es ligeramente más sensible que CrP (Figura 2A), mostrando indicios de lesión renal no detectables mediante CrP. A pesar del incremento, las concentraciones de UP se mantuvieron prácticamente dentro del rango de normalidad (Quimby y Luong, 2007).

Es posible que los ratones desarrollasen una lesión renal no evidenciada por estos parámetros, puesto que la filtración glomerular debe reducirse de forma importante para que CrP y UP aumenten por encima del rango normal (Bagshaw y Bellomo, 2007). A la vista de los resultados, el modelo experimental desarrollado podría corroborar lo descrito en clínica; algunos pacientes desarrollan nefritis tubulointersticial aguda debido al tratamiento con IPCI y no presentan alterados estos biomarcadores (Cortazar *et al.*, 2016).



2A



2B

Figura 2. Evolución temporal de las concentraciones de biomarcadores plasmáticos. Diferencias significativas vs. grupo control: a $p < 0,05$; grupo cisplatino: b $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 10 mg/kg: c $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 15 mg/kg: d $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 10 mg/kg: e $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 20 mg/kg f $p < 0,05$.

4.2. Biomarcadores urinarios

4.2.1. Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)

Las concentraciones basales de NGAL en orina son variables interindividualmente. Por ello, se requiere comparar su evolución respecto a dichas concentraciones (Smertka y Chudek, 2012).

El aumento de NGAL a nivel urinario indica un deterioro temprano de la función renal evidenciable incluso tres días antes del aumento de CrP (Wu y Huang, 2018; Smertka y Chudek, 2012). Las concentraciones de NGAL aumentaron de forma significativa en el grupo de cisplatino a día 6 (Figura 3A) respecto al grupo control, anti-CTLA-4 (10 mg/kg y 15 mg/kg) y anti-PD-1 10 mg/kg, mostrando una leve afectación renal.

Es importante destacar que los IPCI en monoterapia no modificaron significativamente las concentraciones de NGAL respecto a su valor basal (a las dosis y tiempo estudiados), no mostrándose daño renal.

La alteración del parámetro en los grupos de terapia combinada se produjo tanto a día 3 como a día 6 (Figura 3A), mostrando la aparición de una lesión renal. El incremento fue mucho más marcado que en el resto de los grupos, lo que podría mostrar que los IPCI potenciaron el efecto nefrotóxico inducido por cisplatino (Sharp y Siskind, 2017). NGAL aumentó hasta día 6, mostrando un deterioro progresivo de la función renal tras las sucesivas administraciones de inmunoterapia. El aumento de NGAL en orina se relaciona con la aparición de lesiones inflamatorias a nivel de las células del túbulo proximal (Vaidya *et al.*, 2008; Smertka y Chudek, 2012). Por ello, en este caso, su incremento podría reflejar la aparición de nefritis tubulointersticial.

4.2.2. Molécula de daño renal 1 (KIM-1)

Las concentraciones basales de KIM-1 excretadas en orina en condiciones fisiológicas son mínimas y en algunos casos indetectables (Han *et al.*, 2002) como ocurre con los resultados obtenidos a día 0 del experimento (Figura 3B).

Las concentraciones de KIM-1 se mantuvieron en niveles basales a lo largo del experimento en los grupos experimentales de administración de monoterapia, por tanto, no se evidenció daño renal.

En los grupos de administración de terapia combinada las concentraciones de KIM-1 aumentaron progresivamente hasta día 6. El incremento fue significativo tanto a día 3 como a día 6 (Figura 3B). El aumento de KIM-1 podría relacionarse con aparición de fibrosis intersticial y lesión inflamatoria a nivel de los túbulos proximales (Vaidya *et al.*, 2008), así como con necrosis al mismo nivel (Han *et al.*, 2002). El aumento de KIM-1 observado, por tanto, podría reflejar la aparición de nefrotoxicidad a nivel de los túbulos proximales. Probablemente originado por cisplatino (Sharp y Siskind, 2017) y potenciado a este nivel tras sucesivas administraciones de inmunoterapia.

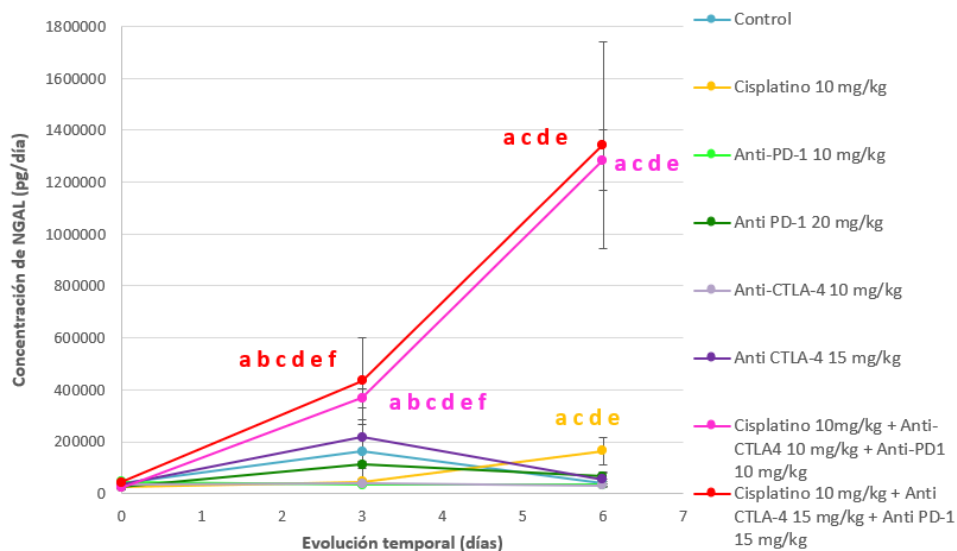
4.2.3. Albúmina

Las concentraciones fisiológicas de albúmina en orina son mínimas por la anatomofisiología del glomérulo renal, que impide el paso de proteínas. Las pocas moléculas que consiguen atravesarlo se reabsorben a nivel tubular (Agrawal y Smoyer, 2017).

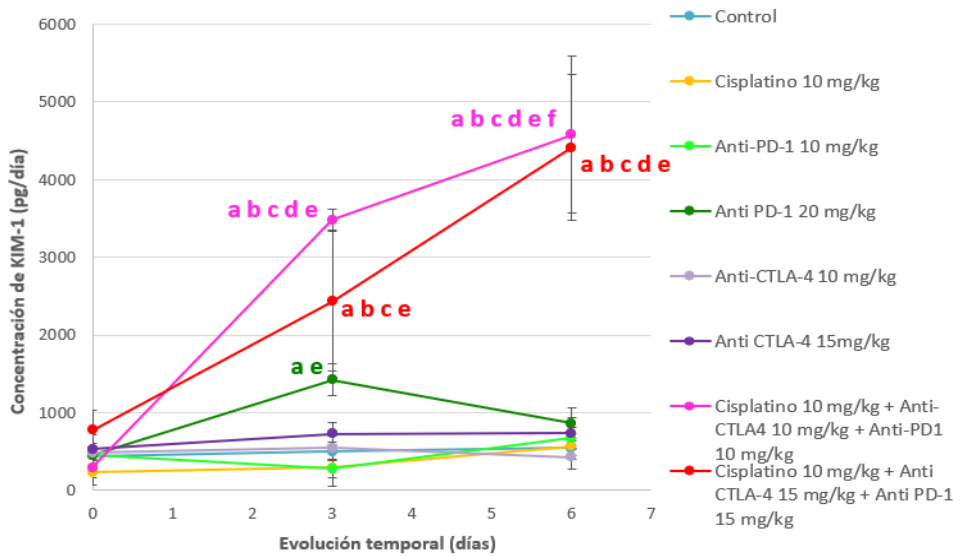
A día 3 (Figura 3C) se produjo un incremento en las concentraciones de albúmina urinaria en los grupos de terapia combinada y en el de cisplatino, mostrando una lesión renal. El aumento de sus concentraciones se relaciona con una disminución de su reabsorción en los túbulos proximales, evidenciable durante los primeros estadios de IRA o por una lesión a nivel glomerular (Vaidya *et al.*, 2008).

El incremento es especialmente importante en los grupos de terapia combinada, mostrándose la aparición de daño renal probablemente inducido por cisplatino a nivel del túbulo proximal y potenciado por la administración de IPCI.

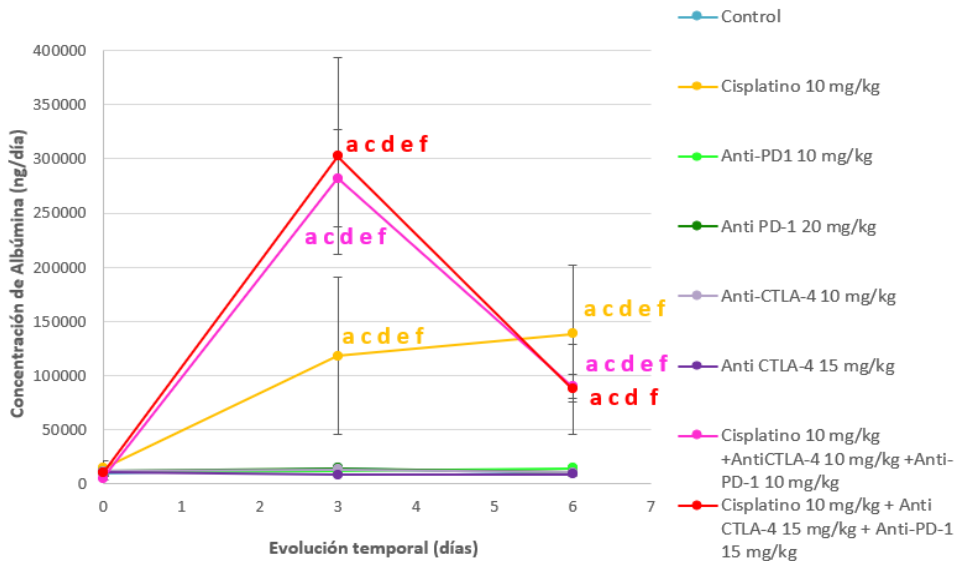
A día 6 (Figura 3C) las concentraciones de albúmina se redujeron en los grupos de terapia combinada. Esto podría deberse a la eliminación de cisplatino y a una posible reparación del daño producido a nivel tubular, recuperando este la capacidad de reabsorción de albúmina. Además, es posible que la albúmina siga un patrón de alteración más característico de cisplatino (pico de daño renal a día 3 en ratón [Sharp y Siskind, 2017]) que el inducido por IPCI (reacciones inflamatorias mantenidas en el tiempo [Perazella y Shirali, 2020]). A pesar de la disminución en las concentraciones, estas fueron superiores a los niveles basales, por lo que la lesión renal se mantuvo.



3A



3B



3C

Figura 3. *Evolución temporal de la concentración de biomarcadores urinarios.* Diferencias significativas vs. grupo control: **a** $p < 0,05$; grupo cisplatino: **b** $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 10 mg/kg; **c** $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 15 mg/kg; **d** $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 10 mg/kg; **e** $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 20 mg/kg **f** $p < 0,05$.

Biomarcadores como NGAL, KIM-1 y albúmina, presentes también en orina humana tras una lesión renal (Wu y Huang, 2018; Agrawal y Smoyer, 2017), podrían resultar ventajosos en la detección del daño renal subclínico, facilitando la instauración precoz de medidas preventivas y de tratamiento personalizadas para disminuir la morbimortalidad asociada a la lesión renal. Su uso podría evitar la administración de corticosteroides y/o suspensión del tratamiento antineoplásico, optimizando la eficacia.

5. CONCLUSIONES

- Este modelo experimental permitió caracterizar el daño renal inducido por la administración de IPCI en monoterapia y combinados con quimioterapia en el ratón. Concluyendo que:
 - No se evidenció efecto nefrotóxico en los grupos de IPCI en monoterapia, a ninguna de las dosis administradas y durante los tiempos estudiados.
 - La administración de terapia combinada provocó un daño renal inducido por cisplatino y potenciado por los IPCI, que se evidenció por la excreción de biomarcadores urinarios relacionados con el daño tubular.
- La batería de biomarcadores de daño renal subclínico resultó útil en el estudio funcional renal, mostrando lesiones renales no detectables con el uso de biomarcadores clásicos.
- No se evidenció un efecto dosis-dependiente en los grupos de terapia combinada.
- La puesta a punto de estos modelos de nefrotoxicidad en terapia combinada permitirá estudiar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a estos tratamientos, así como mejorar el significado diagnóstico de la excreción de biomarcadores urinarios y mejorar el manejo del paciente oncológico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman O, Fouad M. A network meta-analysis of the risk of immune-related renal toxicity in cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Immunotherapy*. 2016 May; 8(5):665-674. DOI: 10.2217/imt-2015-0020
- Agrawal S, Smoyer WE. Role of albumin and its modifications in glomerular injury. *Pflug Arch - Eur J Physiol*. 1 de agosto de 2017; 469(7):975-982. DOI: 10.1007/s00424-017-2029-4
- Bagshaw SM, Bellomo R. Early diagnosis of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2007 Dec; 13(6):638-644. DOI: 10.1097/MCC.0b013e3282f07570

- Centanni M, Moes DJAR, Trocóniz IF, Ciccolini J, van Hasselt JGC. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 2019 Jul; 58(7):835-857. DOI: 10.1007/s40262-019-00748-2
- Cortazar FB, Marrone KA, Troxell ML, Ralto KM, Hoenig MP, Brahmer JR *et al.* Clinicopathological features of acute kidney injury associated with immune checkpoint inhibitors. *Kidney Int.* septiembre de 2016; 90(3):638-647. DOI: 10.1016/j.kint.2016.04.008
- Flynn MJ, Larkin JMG. Novel combination strategies for enhancing efficacy of immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic solid malignancies. *Expert Opin Pharmacother.* 2017 Oct; 18(14):1477-1490. DOI: 10.1080/14656566.2017.1369956
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* julio de 2002 [citado 12 de marzo de 2022]; 62(1):237-244. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x
- Izzedine H, Mateus C, Boutros C, Robert C, Rouvier P, Amoura Z, Mathian A. Renal effects of immune checkpoint inhibitors. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Jun 1; 32(6):936-942. DOI: 10.1093/ndt/gfw382
- Hryniewicki AT, Wang C, Shatsky RA, Coyne CJ. Management of Immune Checkpoint Inhibitor Toxicities: A Review and Clinical Guideline for Emergency Physicians. *J Emerg Med.* octubre de 2018; 55(4):489-502. DOI: 10.1016/j.jemermed.2018.07.005
- Perazella MA, Shirali AC. Immune checkpoint inhibitor nephrotoxicity: what do we know and what should we do? *Kidney Int.* enero de 2020; 97(1):62-74. DOI: 10.1016/j.kint.2019.07.022
- Quimby FW, Luong RH. Clinical Chemistry of the Laboratory Mouse. *Mouse Biomed Res.* 2007; 171-216. DOI: 10.1016/B978-012369454-6/50060-1
- Sharp CN, Siskind LJ. Developing better mouse models to study cisplatin-induced kidney injury. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 1 de octubre de 2017; 313(4):F835-841. DOI: 10.1152/ajprenal.00285.2017
- Smertka M, Chudek J. Using NGAL as an Early Diagnostic Test of Acute Kidney Injury. *Ren Fail.* febrero de 2012; 34(1):130-133. DOI: 10.3109/0886022X.2011.623500
- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48:463-493. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615
- Wu H, Huang J. Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathogenic Mechanisms, Biomarkers and Prevention Strategies. *Curr Drug Metab.* 2018; 19(7):559-567. DOI: 10.2174/1389200218666171108154419

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2023812131>

DISEÑO Y DESARROLLO DE UNA CREMA PAÑAL CON LECHE DE BURRA

Design and Development of a Diaper Cream with Donkey Milk

Beatriz BAUTISTA SÁNCHEZ; Aránzazu ZARZUELO CASTAÑEDA

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Lda. Licenciado Méndez Nieto, s/n. 37007 Salamanca

Correo-e: drury@usal.es

RESUMEN: Debido a la prevalencia de la dermatitis del pañal en la infancia, afección que cursa con irritación e inflamación cutánea de la zona del bebé que se encuentra en contacto directo con el pañal, se planteó buscar una solución a este problema. Para ello, tras estudiar en profundidad la patología, se procedió al desarrollo de una crema pañal capaz de prevenir, paliar y/o tratar el problema. Entre sus ingredientes, cuenta con leche de burra, componente que ha demostrado tener capacidad para mejorar el problema que se describe.

Palabras clave: dermatitis del pañal; crema pañal; leche de burra; formulación cosmética.

ABSTRACT: Due to the prevalence of diaper dermatitis in infancy, a condition that causes skin irritation and inflammation in the area of the baby that is in direct contact with the diaper, it was decided to find a solution to this problem. For this, after studying the pathology in depth, a diaper cream capable of preventing, palliating and/or treating the problem was developed. Among its ingredients, it has donkey milk, a component that has been shown to have the ability to improve the problem described.

Keywords: diaper dermatitis; diaper cream; donkey milk; cosmetic formulation.

1. INTRODUCCIÓN

La dermatitis del pañal se ha convertido en uno de los motivos de consulta pediátrica más comunes (Klunk *et al.*, 2014) en recién nacidos y lactantes con una mayor prevalencia entre los 9 y 12 meses de edad (Blume-Peytavi *et al.*, 2014). Podemos definir esta afección como una irritación e inflamación cutánea localizada dentro del área que se encuentra recubierta por el pañal, es decir, nalgas, zona perianal, genitales, parte interna de los muslos y cintura (Šikić Pogačar *et al.*, 2018).

El principal factor desencadenante de la dermatitis del pañal es la humedad, debida a la combinación del efecto oclusivo del pañal y los deshechos fecales y urinarios; dicha humedad conduce a que la piel sufra un proceso de maceración y, debido a ello, la ruptura del estrato córneo, por lo que será más sensible a la fricción que se produce entre los pliegues de la propia piel y las áreas de contacto con el pañal. Otro factor desencadenante son los diferentes componentes de las heces (proteasas y lipasas), que incrementan su actividad en ambientes en los que el pH es elevado, produciendo la irritación de la piel. Además, este desequilibrio en el pH dificulta el mantenimiento de una flora normal en la piel por lo que será más susceptible a infecciones de especies como *Cándida*, *Estafilococo* y *Estreptococo*.

El cambio de pH es producido principalmente por dos mecanismos:

- Por acción de las ureasas que descomponen la urea de las heces y orina, elevando el pH de la piel.
- Por acción de algunos productos de baño que modifican la flora de la piel y consecuentemente el pH de la misma (Klunk *et al.*, 2014).

Es posible reducir la aparición y/o la gravedad de esta afección enseñando a los padres métodos para lograr que el bebé tenga una piel sana y/o evitar que vuelva aparecer la dermatitis (Šikić Pogačar *et al.*, 2018) como pueden ser:

- Limpieza y cambio de pañal tras la micción y defecación.
- Exposición al aire de la zona el mayor tiempo posible para así reducir el contacto y la fricción con el pañal.
- Baños con agua tibia.
- Aplicar una crema pañal protectora en cada cambio de pañal, cuya finalidad es formar una película lipídica que disminuya la humedad y el contacto con agentes irritantes y ayudar a la cicatrización de la piel afectada (Šikić Pogačar *et al.*, 2018).

Dentro del campo de la cosmética con finalidad protectora, la leche de burra se ha postulado en los últimos años como un ingrediente cosmético efectivo, aunque

su uso como tal data de la antigüedad, pues es sabido que personajes históricos como la reina Cleopatra o Popea (esposa del emperador Nerón) la usaban para bañarse en ella y obtener como resultado una piel fresca, suave, tersa y brillante (Kocic *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta las características organolépticas de la leche de burra, esta puede ser descrita como solución blanca, aguada, con un aspecto lechoso y de sabor dulce (Li *et al.*, 2022). En cuanto a su composición cabe destacar que se asemeja bastante a la leche humana ya que tiene un contenido similar en lactosa, proteína total y proteína de suero, alejándose, por tanto, de la del resto de rumiantes, como vaca, búfalo, oveja, cabra y camello (Aspri *et al.*, 2017). A pesar de su parecido con la humana, la leche de burra tiene un mayor contenido en lisozima, que por su acción inmunológica ofrece recuentos microbianos muy bajos.

Hoy en día, su gran valor radica en su alto contenido en vitaminas A, B1, B2, B6, C, D y E, en minerales como calcio, magnesio, fósforo o zinc y en oligoelementos y ácidos grasos Omega 3 y 6.

De forma general, podemos decir que algunas de las propiedades distintivas de la leche de burra son su capacidad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena (Li *et al.*, 2022), siendo además muy útil para combatir el estreñimiento, el cansancio, el agotamiento, la debilidad, la desnutrición. También está constatado el refuerzo del sistema inmunológico.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido formular una crema para la dermatitis del pañal con propiedades preventivas, calmantes y curativas de dicha patología sufrida en la infancia, en cuya composición el ingrediente principal y distintivo de otras formulaciones existentes en el mercado sea la leche de burra.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Revisión bibliográfica*

Para llevar a cabo este trabajo, inicialmente se realizó una revisión bibliográfica para conocer las características de la patología a tratar y las propiedades de la leche de burra. Dicha búsqueda se realizó en los buscadores Google académico y Pubmed. Así mismo, se obtuvo información a través de revistas científicas de la editorial Elsevier.

Los textos que se tomaron como referencia para la consulta fueron aquellos escritos en inglés y que estaban datados entre 2005 y 2021, dando una mayor importancia a la información extraída de los artículos más relevantes.

Para conocer las características de este tipo de formulaciones, se realizó un estudio en profundidad de las cremas de pañal con mayor demanda disponibles en el mercado, con el fin de definir qué excipientes se podrían usar y sus posibles combinaciones.

3.2. Metodología

La metodología para la elaboración de las distintas formulaciones diseñadas queda recogida de forma esquemática a continuación:

- Calentar el/los componentes grasos sólidos hasta su fundición.
- Calentar el/los aceites y los ingredientes líquidos hasta alcanzar la temperatura de fusión de los componentes sólidos.
- Mezclar ambas soluciones bajo agitación constante a una temperatura de 60 °C.
- Añadir el resto de los componentes sólidos, en agitación constante, disminuyendo la temperatura hasta 30-35 °C.
- Atemperar glicerina a 30 °C para posteriormente disolver la leche de burra agitando a 700 rpm.
- Mezclar y agitar las distintas fases hasta lograr una emulsión homogénea.
- Envasar y enfriar en el recipiente de acondicionamiento.

4. RESULTADOS

El estudio bibliográfico puso de manifiesto los beneficios que aporta la leche de burra, en combinación con otros ingredientes, en este tipo de formulaciones como agentes para controlar la humedad, las infecciones microbianas, el cambio de pH y la posterior inflamación e irritación.

- **HUMEDAD:** La leche de burra presenta propiedades hidratantes, por lo que contribuirá a la hidratación de la zona de aplicación y evitará que se produzca una pérdida de agua transdérmica que aumente la humedad en la zona (Kocic *et al.*, 2020). Como ingredientes coadyuvantes para evitar que la humedad produzca daños en la epidermis del bebé, la formulación debe contar con componentes oclusivos, como el óxido de zinc o la cera.
- **pH:** Como se ha comentado, un pH elevado constituye el medio idóneo para la proliferación bacteriana, además de ser el principal desencadenante de procesos inflamatorios que pueden derivar en un proceso de dermatitis, por lo que es importante que el pH de la zona pañal sea más bien ácido. De

este modo, las enzimas que están implicadas en la síntesis de fosfolípidos y en la diferenciación de la barrera cutánea tendrán una acción catalítica óptima con lo que se logra disminuir la inflamación de la zona afectada (Kocic *et al.*, 2020). La leche de burra ha demostrado tener la capacidad de mantener el pH de la piel ligeramente ácido evitando así que el problema derive a una dermatitis del pañal.

- **PROLIFERACIÓN DE PATÓGENOS.** En el suero de la leche de burra existe una importante fracción proteica, destacando dos proteínas claves para evitar la proliferación de patógenos: lisozima y α -lactoalbúmina.

La lisozima cuenta con propiedades bactericidas, ya que esta enzima puede dañar la pared celular de bacterias de dos modos: rompiendo el peptidoglicano o mureína que protege a las de tipo Gram+ (Martini *et al.*, 2021) o hidrolizando algún polisacárido que forma parte de esta pared celular (Kocic *et al.*, 2020). Esto hará que disminuya el número de infecciones en la superficie de la piel (Kocic *et al.*, 2020) y, por tanto, sea responsable del efecto inmunomodulador (Martini *et al.*, 2021). Además la acción sinérgica de la lisozima con la lactoferrina y algún ácido graso libre ha demostrado mejorar la actividad antibacteriana (Zimecki y Artym, 2005), antifúngica y antiprotozoaria (Vita *et al.*, 2007).

En cuanto a la α -lactoalbúmina, ha demostrado tener propiedades antivirales, antitumorales y antiinflamatorias (Kocic *et al.*, 2020), e incluso ha demostrado efectividad frente algún papiloma cutáneo (Zimecki y Artym, 2005).

La leche aporta a la piel, junto con la α -lactoalbúmina y la lisozima, una serie de aminoácidos esenciales que colaboran en la restauración de las proteínas que forman las membranas celulares e incluso compartimentos intracelulares de las células (Kocic *et al.*, 2020). No debemos dejar de mencionar otra proteína, la caseína, puesto que esta tiene un alto poder nutritivo, que ayudará a restaurar la piel del bebé (Kocic *et al.*, 2020).

Aunque el componente cosmético activo principal para la crema a desarrollar es la leche de burra, es necesaria la presencia de otros ingredientes y el estudio realizado nos permitió seleccionar posibles candidatos tales como:

- *Aceite de oliva*: reduce la síntesis de prostaglandinas en el lugar de aplicación, inhibe el crecimiento de hongos o bacterias y tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria (Al-Waili, 2005).
- *Cera de abeja*: forma una película sobre la piel sin obstruir los poros, además de tener propiedades bactericidas. Por otro lado, tiene la capacidad de calmar y prevenir la inflamación y regenerar la piel (Kovács *et al.*, 2020).

- *Germen de trigo*: contiene vitaminas que ayudan a combatir la irritación, la sequedad y el agrietamiento de la piel. Además minimiza los síntomas de la dermatitis (Thakur, 2012) y ha demostrado tener capacidad cicatrizante en las heridas (Zakaria *et al.*, 2021).
- *Manteca de karité*: posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes por sus componentes no glicéridos (Honfo *et al.*, 2014).
- *Aceite de almendras*: mantiene la elasticidad de la piel, es emoliente y ha demostrado eficacia en la hidratación del estrato córneo de bebés logrando un efecto protector contra futuros episodios de dermatitis del pañal (Ouzir *et al.*, 2021).
- *Caléndula*: previene el daño de la piel debido al aumento de la hidratación de la misma.
- *Lavanda*: actúa como antibacteriano, antifúngico, antioxidante y antiinflamatorio.
- *Óxido de zinc*: sustancia oclusiva ya que forma una película lipídica en la superficie de la piel. Repara el estrato córneo y previene la irritación de la piel.
- *Aceite de aguacate*: puede alterar la barrera de la piel para potenciar la permeabilidad de otros compuestos. Por otro lado, presenta un efecto antioxidante y puede colaborar en el mantenimiento de la homeostasis de la barrera cutánea evitando un proceso inflamatorio.
- *Hipérico*: tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y estimulantes del crecimiento y diferenciación de los queratinocitos.
- *Glicerina*: su uso está limitado a ayudar en la disolución de la leche de burra.

Para obtener como resultado final una crema pañal que cumpliera con los objetivos marcados, se probaron diferentes combinaciones de ingredientes, con el fin de obtener una formulación con las características buscadas.

El primer objetivo a cumplir fue conseguir unas propiedades cosméticas adecuadas para este tipo de formulaciones, de fácil aplicación y agradable al tacto, proporcionadas por una textura ligera y ausencia de grumos.

Las tres fórmulas inicialmente propuestas fueron las recogidas en la Tabla 1.

TABLA 1. Composición cualitativa y cuantitativa de las tres primeras formulaciones desarrolladas

Ingredientes	Fórmula A	Fórmula B	Fórmula C
Aceite de almendras	6 %	20 %	45 %
Aceite de aguacate	-	10 %	20 %
Aceite de oliva	45 %	40 %	-
Caléndula	4 %	7 %	6 %
Cera de abeja	15 %	8 %	8 %
Germen de trigo	12,5 %	-	-
Glicerina	-	-	6 %
Hipérico	-	5 %	-
Lavanda	3 %	-	-
Manteca de karité	12 %	-	-
Óxido de zinc	2,5 %	10 %	15 %

Las dos primeras formulaciones, A y B, fueron demasiado consistentes, lo que dificultaba su aplicación, por lo que se siguió trabajando con base en la fórmula C, que se amoldaba más a las especificaciones fijadas inicialmente, probablemente debido a la incorporación de glicerina. Sobre la fórmula C se hicieron modificaciones para conseguir la formulación óptima: las cinco fórmulas probadas quedan recogidas en la Tabla 2.

TABLA 2. Composición cualitativa y cuantitativa de las modificaciones de la fórmula C probadas

Ingredientes	F. 1	F. 2	F. 3	F. 4	F. 5
Aceite de almendras	-	42 %	42 %	-	-
Aceite de aguacate	16 %	-	-	20 %	20 %
Aceite de oliva	45 %	-	-	40 %	40 %
Caléndula	7 %	6 %	6 %	8 %	9 %

Ingredientes	F. 1	F. 2	F. 3	F. 4	F. 5
Cera de abeja	6 %	6 %	8 %	6 %	6 %
Germen de trigo	-	-	10 %	-	-
Glicerina	2 %	3 %	3 %	3 %	3 %
Hipérico	-	10 %	-	-	-
Leche de burra	2 %	3 %	3 %	3 %	2 %
Lavanda	-	-	3%	-	-
Manteca de karité	12 %	15 %	10 %	10 %	10 %
Óxido de zinc	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %

El segundo y principal objetivo fue incluir leche de burra en la composición, lo que se convirtió en un problema debido a su difícil integración, ya que la leche de burra utilizada se encontraba en polvo liofilizada para asegurar la estabilidad de la misma.

Se probaron diferentes estrategias para conseguir que en la formulación final no aparecieran grumos a causa de la leche y que ésta quedara completamente integrada en la crema. Tras probar varias estrategias, la que ofreció mejores resultados fue la de mezclar la glicerina con la leche a una temperatura de 30 °C y agitar a una velocidad de 700 rpm durante 5 minutos antes de incorporarlo al resto de la formulación. Este paso fue clave para conseguir el resultado buscado, ya que, si la temperatura aumentaba demasiado, había riesgo de que la leche se degradase y, si no se agitaba a esa velocidad, no se lograba que el producto se integrara correctamente y, por tanto, el resultado no era cremoso.

Al desarrollar de forma práctica la formulación número 3, se observó que no tenía la consistencia adecuada, ya que los bordes presentaban una apariencia más compacta de la deseada y el centro era demasiado fluido, lo que ponía de manifiesto una difícil integración de las fases y potenciales problemas de estabilidad de la formulación, motivos por los que se descartó dicha formulación. Por otra parte, al elaborar y caracterizar la fórmula 4, vimos que al extenderla había grumos y que presentaba un color amarillento-parduzco. Estas dos razones fueron suficientes para descartarla, ya que la cosmetividad no era la esperada: la textura y el color no iban a ser agradables para el consumidor.

Las formulaciones que más se ajustan a las características que debe cumplir la crema pañal eran la 1, 2 y 5, cuyo proceso de elaboración se esquematiza en la Figura 1.

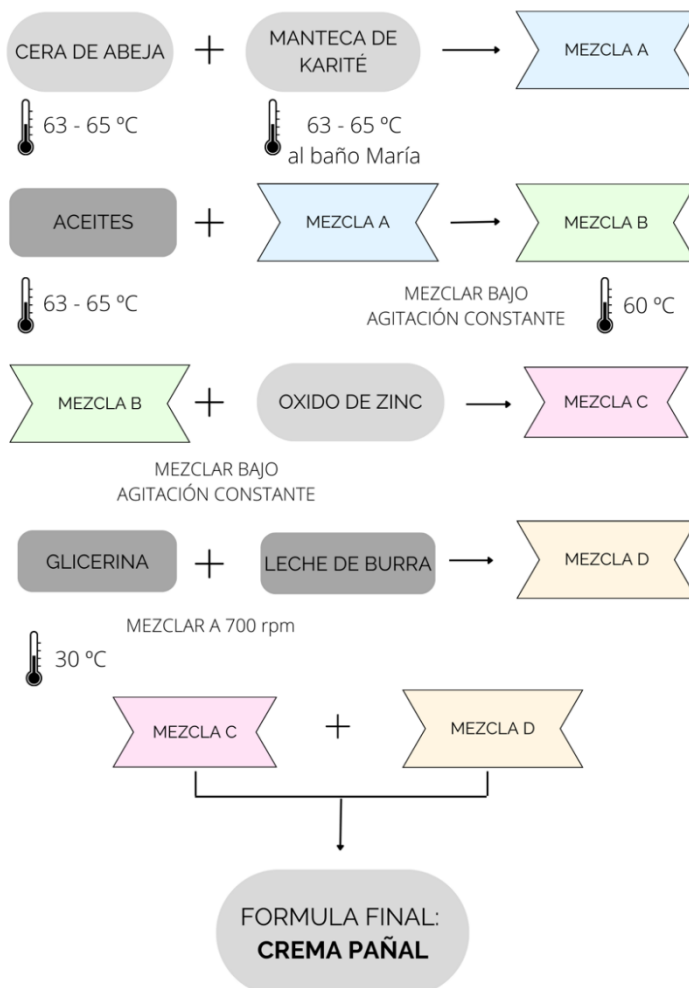


Figura 1: Esquema general de elaboración de la fórmula.

En una segunda fase y una vez definida la composición, para comprobar que las cremas cumplen los objetivos de la formulación, éstas deben ser testadas, fase actual del estudio, en el que se están probando las 3 formulaciones seleccionadas en un grupo de 20 bebés que sufren dermatitis del pañal. Para ello se ha dividido a los bebés en cuatro grupos de cinco miembros, de tal forma que cada uno está probando una de las tres formulaciones a excepción de uno que está utilizando una formulación placebo, sin leche de burra.

5. CONCLUSIONES

La leche de burra ha demostrado ser un ingrediente adecuado para prevenir, curar y/o paliar la dermatitis del pañal debido a sus propiedades, sobre todo en combinación con otros ingredientes cosméticos como aceite de oliva, aceite de almendras o aguacate, óxido de zinc, caléndula, cera de abeja y manteca de karité.

Por su cosmeticidad y propiedades organolépticas, de las distintas combinaciones desarrolladas, destacamos las formulaciones siguientes:

- Aceite de aguacate (16 %); aceite de oliva (45 %); caléndula (7 %); cera de abeja (6 %); glicerina (2 %); leche de burra (2 %); manteca de karité (12 %); óxido de zinc (10 %).
- Aceite de almendras (42 %); caléndula 6 %); cera de abeja (6 %); glicerina (3 %); hipérico (10 %); leche de burra (3 %); manteca de karité (15 %); óxido de zinc (10 %).
- Aceite de aguacate (20 %); aceite de oliva (40 %); caléndula (9 %); cera de abeja (6 %); glicerina (3 %); leche de burra (2 %); manteca de karité (10 %); óxido de zinc (10 %).

Éstas son las que más se ajustan a los objetivos del producto y, por tanto, cualquiera de ellas podría ser usada para prevenir y tratar la dermatitis del pañal, aunque las pruebas iniciales han puesto de manifiesto que la formulación con una proporción aceite de aguacate/oliva (1:2) es la que mejores características cosmetológicas presenta.

Si los resultados completos tras testar las formulaciones confirman los resultados preliminares, podríamos asegurar, tanto desde el punto de vista teórico como el experimental, los beneficios de la leche de burra y proponer la formulación para su comercialización.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Waili NS. Clinical and mycological benefits of topical application of honey, olive oil and beeswax in diaper dermatitis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 11(2):160-163. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01013.x>
- Aspri M, Economou N, Papademas P. Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Reviews International*. 2017; 33(3):316-333. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175014>
- Blume-Peytavi U, Hauser M, Lünemann L, Stamatatos GN, Kottner J, Garcia Bartels N. Prevention of Diaper Dermatitis in Infants-a Literature Review. *Pediatric Dermatology*. 2014; 31(4):413-429. <https://doi.org/10.1111/pde.12348>

- Honfo FG, Akissoe N, Linnemann AR, Soumanou M, Van Boekel MAJS. Nutritional Composition of Shea Products and Chemical Properties of Shea Butter: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014; 54(5):673-686. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.604142>
- Klunk C, Domingues E, Wiss K. An update on diaper dermatitis. *Clinics in Dermatology*. 2014; 32(4):477-487. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.02.003>
- Kocic H, Stankovic M, Tirant M, Lotti T, Arsic I. Favorable effect of creams with skimmed donkey milk encapsulated in nanoliposomes of skin physiology. *Dermatologic Therapy*. 2020; 33(4):23. <https://doi.org/10.1111/dth.13511>
- Kovács A, Péter-Héderi D, Perei K, Budai-Szücs M, Léber A, Gácsi A, Csányi E, Berkó S. Effects of Formulation Excipients on Skin Barrier Function in Creams Used in Pediatric Care. *Pharmaceutics*. 2020; 12(8):1-15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080729>
- Li Y, Ma Q, Liu G, Wang C. Effects of donkey milk on oxidative stress and inflammatory response. *Journal of Food Biochemistry*. 2022; 46(4):1-15. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13935>
- Martini M, Altomonte I, Tricò D, Lapenta R, Salari F. Current Knowledge on Functionality and Potential Therapeutic Uses of Donkey Milk. *Animals*. 2021; 11(5):1-15. <https://doi.org/10.3390/ani11051382>
- Ouzir M, Bernoussi SE, Tabyaoui M, Taghzouti K. Almond oil: A comprehensive review of chemical composition, extraction methods, preservation conditions, potential health benefits, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021; 20(4):3344-3387. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12752>
- Šikić Pogačar M, Maver U, Marčun Varda N, Mičetić-Turk, D. Diagnosis and management of diaper dermatitis in infants with emphasis on skin microbiota in the diaper area. *International Journal of Dermatology*. 2018; 57(3):265-275. <https://doi.org/10.1111/ijd.13748>
- Thakur NK. Formulation and Characterization of Benzoyl Peroxide Gellified Emulsions. *Scientia Pharmaceutica*. 2012; 80(4):1045-1060. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1206-09>
- Vita D, Passalacqua G, Di Pasquale G, Caminiti L, Crisafulli G, Rulli I, Pajno GB. Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy: Crossover comparison with goat's milk. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2007; 18(7):594-598. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00567.x>
- Zakaria R, Musa RJ, Faraj J, Mahmoud Abudayeh ZH, Mohammed HA. Evaluation of the Wheat Germ Oil Topical Formulations for Wound Healing Activity in Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2021; 24(6):706-715.
- Zimecki M, Artym J. Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 2005; 59:309-323.

VALORACIÓN DE LA INCIDENCIA DE PRM/RNM EN PACIENTES TRATADOS CON ANTICOAGULANTES ORALES Y EVALUACIÓN DE LA INTERVENCIÓN FARMACÉUTICA EN FARMACIA COMUNITARIA

Assessment of the Incidence of DRP/NOM in Patients Treated with Oral Anticoagulants and Evaluation of Pharmaceutical Intervention in Community Pharmacy

Laura María MARTÍNEZ DE MORENTIN DE BENITO; Carlos TRECEÑO LOBATO; Elena VALLES MARTÍN

Farmacia Treceño Lobato. Calle Doctor Morales, s/n. 47001. Valladolid, España
Correo-e: elenitavm@usal.es

RESUMEN: En los últimos años se ha incrementado el consumo de anticoagulantes orales debido a la alta incidencia de enfermedades cardiovasculares y al desarrollo de nuevos medicamentos. Estos fármacos están relacionados con un elevado índice de problemas de salud relacionados con PRM/RNM.

Se realizó un estudio observacional y transversal en una farmacia comunitaria urbana de Valladolid para evaluar la seguridad de los ACOD en comparación con los AVK en función de la identificación de PRM/RNM en pacientes ambulatorios.

El número de PRM/RNM por paciente en la muestra fue de 10,15, que implicaba 5,45 intervenciones potenciales. Los pacientes tratados con ACOD presentaron 2,3 PRM/RNM más que los tratados con AVK, lo que deriva en 1,3 intervenciones potenciales más. Sin embargo, cuando tenemos en cuenta sólo los PRM/RNM derivados de la terapia anticoagulante, los AVK producen 3,0 PRM/RNM frente a 1,4 PRM/RNM derivados del consumo de ACOD. Además, los pacientes tratados con AVK tienen 1,20 PRM/RNM moderados o graves más que los pacientes tratados con ACOD.

Estos datos demuestran que este tipo de pacientes debe ser un objetivo proactivo en los programas de atención farmacéutica.

Palabras clave: anticoagulantes orales; fibrilación auricular; tromboembolismo; atención farmacéutica; PRM/RNM.

ABSTRACT: In recent years, consumption of oral anticoagulants has increased due to the high incidence of cardiovascular diseases and the development of new drugs. These drugs are associated with a high rate of DRP/NOM related health problems.

An observational and cross-sectional study was carried out in an urban community pharmacy in Valladolid to evaluate the safety of DOACs compared to VKAs based on the identification of DRP/NOM in outpatients.

The number of DRP/NOM per patient in the sample was 10.15, which implied 5.45 potential interventions. The patients treated with DOACs presented 2.3 DRP/NMO more than those treated with VKA, which leads to 1.3 more potential interventions. However, when we take into account only the DRP/NOM only derived from anticoagulant therapy, VKAs produce 3.0 DRP/NOM compared to 1.4 DRP/NOM derived from the consumption of DOACs. In addition, patients treated with VKAs have 1.20 moderate or severe DRP/NOM more than patients treated with DOACs.

These data demonstrate that this type of patient should be a proactive target in pharmaceutical care programs.

Keywords: oral anticoagulants; atrial fibrillation; thromboembolism; pharmaceutical care; DRP/NOM.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares tienen un innegable impacto en la morbimortalidad de la población, en especial en los países del Norte Global. En los últimos años se ha incrementado significativamente su uso. En 2010, el consumo de estos fármacos era de 6,62 dosis diaria definida por mil habitantes y día (DHD), lo que significa que el 0,6 % de la población estaba tratada con anticoagulantes, de los cuales la práctica totalidad (93%) era acenocumarol. En 2018 este número se dobló, alcanzándose un consumo de 12,45 DHD, lo que implica que un 1,24 % de la población estaría anticoagulada (más de 30.000 pacientes en Castilla y León) (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021).

Estos datos indican que el consumo de anticoagulantes directos alcanzó en 2018 un 47 % del total de anticoagulantes a pesar de la limitación que suponen las restricciones en la dispensación de estos fármacos (visado de inspección) y que el informe de posicionamiento terapéutico de la AEMPS prioriza el uso de AVK en pacientes con fibrilación auricular no valvular (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2016; Foro de Atención Farmacéutica-Farmacia Comunitaria, 2019). Los ensayos clínicos pivotaes y los metaanálisis publicados demuestran que los ACOD son tan eficaces como los AVK y presentan una mortalidad menor, sobre todo por la menor incidencia de hemorragia intracraneal (Connolly *et al.*, 2009; Giugliano *et al.*, 2013; López *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2019; Schulman *et al.*, 2014).

En este trabajo, para comprobar si los pacientes anticoagulados oralmente realizan un uso adecuado de esta medicación, se tomará, por un lado, a pacientes tratados con antagonistas de vitamina K y, por otro, a pacientes que estén usando inhibidores directos, y se analizarán los posibles PRM, que son aquellas situaciones que causan o pueden causar la aparición de un resultado negativo asociado al uso de medicamentos (RNM). Los PRM son elementos del proceso que suponen al usuario de medicamentos un mayor riesgo de sufrir un RNM. Posteriormente, se analizará el posible desarrollo de RNM, que es un problema de salud no controlado en el paciente, atribuible al uso (o falta de uso) de los medicamentos, bien porque no se ha alcanzado el objetivo terapéutico deseado o porque se está produciendo un daño adicional (reacciones o efectos adversos de los medicamentos) (Foro de Atención Farmacéutica-Farmacia Comunitaria, 2019).

TABLA 1. Fármacos anticoagulantes orales y sus principales características
(Treceño y Jiménez, 2021)

Fármacos	Antagonistas de vitamina K (AVK) “Clásicos o indirectos” (B01AA)		Anticoagulantes directos (ACOD)	
	Warfarina (Aldocumar ®)	Acenocumarol (Sintrom ®)	Rivaroxabán (Xarelto®) Apixabán (Eliquis®) Edoxabán (Lixiana®)	Dabigatrán etexilato (Pradaxa®)
Mecanismo de acción	Interfieren en la síntesis hepática de los factores de la coagulación II, VII, IX y X y reducen sus niveles de manera dosis-dependiente.		Inhibidores del factor Xa (B01AF). Inhibidor de trombina (B01AE).	
Indicación	Tratamiento y prevención de trombosis venosa y de fibrilación auricular, además de para la profilaxis de tromboembolismo asociado a prótesis.		Prevención de ictus o embolias en pacientes con fibrilación auricular y otros factores de riesgo, en el tratamiento de trombosis venosa y en la profilaxis de embolia pulmonar en pacientes con trombosis venosa diagnosticada.	
Reacciones adversas	Sangrado y úlceras bucales.		Hemorragias.	
Acción ante una reacción adversa	Ante hemorragias bruscas se debe suspender inmediatamente el tratamiento, administrar transfusión y vitamina K.		Se puede administrar factor VIIa o protrombina. Existe un antídoto específico, el idarucizumab.	

<p>Interacciones que potencian la acción anticoagulante</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos de amplio espectro por afectar a la flora intestinal que produce vitamina K. • AAS y otros AINES al ejercer una acción antiagregante plaquetaria y pudiendo llegar a producir hemorragia digestiva. • ISRS que disminuyen la captación de serotonina por parte de las plaquetas y favorecen la aparición de hemorragia. 	<ul style="list-style-type: none"> • AAS y otros AINES antiagregante plaquetaria y pudiendo llegar a producir hemorragia digestiva. • ISRS de serotonina que disminuyen la captación de serotonina por parte de las plaquetas y favorecen la aparición de hemorragia. 	<ul style="list-style-type: none"> • AAS y otros AINES al ejercer una acción antiagregante plaquetaria y pudiendo llegar a producir hemorragia digestiva. • ISRS de serotonina que disminuyen la captación de serotonina por parte de las plaquetas y favorecen la aparición de hemorragia • Amiodarona: inhibición de la glicoproteína P, al ser el dabigatrán sustrato de la Gp-P.
<p>Interacciones que reducen la acción anticoagulante</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina y carbamazepina que al ser inductores enzimáticos inducen el metabolismo de anticoagulantes. • Anticoceptivos orales que pueden incrementar la síntesis de los factores VII y X de coagulación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina y carbamazepina que al ser inductores enzimáticos inducen el metabolismo de anticoagulantes. 	
<p>Controles especiales</p>	<p>Se deben monitorizar por medio del tiempo de protrombina que se suele hacer valorando el cociente internacional normalizado (INR), que es el índice que indica el tiempo que tarda en coagularse la sangre de una persona y que debe estar comprendido entre 2-3,5. Tener especial precaución con alimentos ricos en vitamina K.</p>		

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las hipótesis planteadas son:

- Evaluar el riesgo de registrar un problema de salud (PS) derivado de un PRM/RNM en pacientes tratados con anticoagulantes orales.
- Valorar si el riesgo de registrar un PS derivado de un PRM/RNM es mayor en los pacientes tratados con anticoagulantes clásicos respecto a los anticoagulantes de acción directa.
- Evaluar el potencial de la intervención del farmacéutico reduciendo la incidencia de PS en estos pacientes.

Con base en esto, el objetivo principal es evaluar la seguridad de los ACOD en comparación con los AVK en función de la identificación de PRM/RNM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Diseño del estudio*

Se trata de un estudio observacional y transversal que ha sido realizado en la Farmacia Treceño Lobato CB, farmacia urbana de la calle Doctor Morales, s/n, de Valladolid.

3.2. *Población diana y tamaño de muestra*

Por un proceso de aleatorización simple y por la siguiente ecuación: $N = (Z\alpha^2 P Q)/d^2$

Siendo:

$Z\alpha$ 1,96 para una confianza del 95 %

P: la prevalencia de pacientes en tratamiento con ACOD en la población es del 1,2 %

Q: (1-P)

d: precisión del 5 %

$N = 18$; para asumir las pérdidas consideradas la muestra será de 22 pacientes. Por lo que se han tomado 11 pacientes bajo tratamiento de ACOD y 11 con AVK. Se han recogido estos datos durante dos meses.

El protocolo del estudio se envió al Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Área de Salud Valladolid Este y, tras obtener el dictamen favorable con el código PI 22-2926 TFG NO HCUV, se comenzó el estudio.

A cada paciente se le han explicado los términos incluidos en el consentimiento informado, debiendo firmarlo para la protección de datos y, posteriormente, se le ha realizado un cuestionario que incluía edad, sexo, tratamiento habitual, problema de salud que le llevó a la prescripción del anticoagulante y si había tenido algún problema de salud en los últimos 12 meses para analizar si estaba relacionado con la toma del anticoagulante.

3.3. *Criterios de exclusión*

- 1) Pacientes que lleven menos de un año en tratamiento con el anticoagulante oral o que haya sido discontinuo en el tiempo, o tratados con un anticoagulante oral diferente en el último año.
- 2) Pacientes con deterioro cognitivo o que no pueden responder a la encuesta.

3.4. *Variables a analizar en el estudio y herramientas utilizadas*

3.4.1. Análisis descriptivo de la muestra

Incluyendo edad, sexo, tratamiento, diagnóstico, PRM/RNM, PS. Consideramos un PRM/RNM como moderado o grave cuando requiere intervención más allá del ámbito de la intervención del farmacéutico para su resolución potencial. Para el tratamiento de estos datos se ha empleado el programa ViDAL Vademecum Drug Information Systems.

3.4.2. Análisis bivariante

Entre la tasa de incidencia de PS derivados de un PRM/RNM producido por el tipo de tratamiento anticoagulante y el resto de las variables de la muestra, con cálculo de OR (IC 95 %) y p valor. En este análisis estadístico se han utilizado las herramientas Excel y RevMan, considerando un IC al 95 % con p valor de 0,05, siendo estadísticamente significativo cuando p valor < 0,05 y el intervalo de confianza no incluye el 0.

4. RESULTADOS

El trabajo de campo se realizó a lo largo de los meses de noviembre y diciembre de 2022 recabándose finalmente 20 pacientes, 10 por cada cohorte considerada.

TABLA 2. Características de la muestra (n = 20)

Características	Muestra n (%)
Edad (años)	
Media ± DE	79,75 ± 10,26
• Anticoagulantes directos	10 (50)
Media ± DE	77,7 ± 7,42
• Anticoagulantes AVK	10 (50)
Media ± DE	81,8 ± 12,56
Sexo	
Mujeres	12 (60)
Hombres	8 (40)
N.º de tratamientos concomitantes	
Media ± DE	7,75 ± 3,46
• Anticoagulantes directos	10 (50)
Media ± DE	8,4 ± 3,17
• Anticoagulantes AVK	10 (50)
Media ± DE	7,1 ± 3,78
Valor de p	0,4
Patología (ACO)	
Fibrilación auricular	7 (35)
Profilaxis del tromboembolismo en cardiopatía	7 (35)
Embolia pulmonar	3 (15)
Tromboflebitis	2(10)
Prevención de tromboembolismo postcirugía	1 (5)
• Anticoagulantes directos	10 (50)
Fibrilación auricular	7 (70)

Características	Muestra n (%)
Tromboflebitis	1 (10)
Embolia	1 (10)
Prevención de tromboembolismo postcirugía	1 (10)
• Anticoagulantes AVK	10 (50)
Profilaxis del tromboembolismo en cardiopatía	7 (70)
Embolia pulmonar	2 (20)
Tromboflebitis	1 (10)
N.º de PRM/RNM	
Media ± DE	10,15± 6,82
• Anticoagulantes directos	10 (50)
Media ± DE	11,3 ± 6,15
• Anticoagulantes AVK	10 (50)
Media ± DE	9,00 ± 7,59
Diferencia (IC95)	2,30 (-3,75, 8,35)
Valor de P	0,37
N.º de intervenciones potenciales	
Media ± DE	5,45 ± 6,82
• Anticoagulantes directos	10 (50)
Media ± DE	6,10 ± 3,14
• Anticoagulantes AVK	10 (50)
Media ± DE	4,80± 3,91
Diferencia (IC95)	1,3 (-1,81, 4,41)
Valor de P	0,41

TABLA 3. Características de los PRM/RNM e intervenciones

Características	Muestra n (%)
<u>Tipo de PRM</u>	
• Anticoagulantes directos	113 (55,7)
Duplicidad	4 (3,5)
Interacciones con otros medicamentos, plantas medicinales, complementos alimenticios o alimentos	48 (42,5)
Alta probabilidad de efectos adversos	49 (43,64)
Dosis, pauta y/o duración no adecuada	4 (3,5)
Precaución de uso	3 (2,7)
Problema de salud insuficientemente tratado	5 (4,4)
Media ± DE	11,3 ± 6,15
• Anticoagulantes AVK	90 (44,3)
Duplicidad	2 (2,2)
Interacciones con otros medicamentos, plantas medicinales, complementos alimenticios o alimentos	40 (44,4)
Alta probabilidad de efectos adversos	42 (46,7)
Dosis, pauta y/o duración no adecuada	5 (5,6)
Contraindicación	1 (1,1)
Media ± DE	9,00 ± 7,59
<u>PRM relacionados con la terapia anticoagulante</u>	
• Anticoagulantes directos	
Total PRM	14 (12,4)
Media ± DE	1,4 ± 1,26

Características	Muestra n (%)
• Anticoagulantes AVK	
Total PRM	30 (33,3)
Media ± DE	3,0 ± 1,63
Diferencia (IC95)	-1,60 (-2,88, -0,32)
Valor p	0,01*
<u>PRM moderados o graves</u>	
• Anticoagulantes directos	
Total PRM	49 (43,4)
Media ± DE	4,9 ± 3,51
• Anticoagulantes AVK	61 (67,7)
Media ± DE	6,1 ± 5,76
Diferencia (IC95)	-1,20 (-5,38, 2,98)
Valor p	0,57
<u>Intervenciones</u>	
• Anticoagulantes directos	61 (56,0)
Derivar al MAP proponiendo cambios en el tratamiento	4 (6,5)
Derivar al médico de atención primaria (MAP) comunicando el PRM/RNM	14 (23,0)
Ofrecer educación sanitaria	43 (70,5)
• Anticoagulantes AVK	48 (44,0)
Derivar al médico de atención primaria (MAP) comunicando el PRM/RNM	20 (41,6)
Ofrecer educación sanitaria	28 (58,3)

Los pacientes tratados con ACOD toman una media de 8,4 medicamentos frente a 7,1 de los pacientes tratados con AVK, sin que esta diferencia sea estadísticamente significativa.

En cuanto a los PRM, son más probables en ACOD, debido a que estos pacientes toman más medicamentos. Por esta razón, existe un mayor número de intervenciones potenciales en ellos. Esto hace que el perfil de los pacientes y sus tratamientos puedan ser diferentes; en el caso de los pacientes con ACOD es frecuente el uso de fármacos antiarrítmicos como amiodarona o betabloqueantes que también implican un número significativo de PRM/RNM.

Los tipos de PRM más frecuentes son para ambos casos las interacciones y la alta probabilidad de efectos adversos. Esto puede desencadenar en un RNM de inseguridad no cuantitativa, que en muchos casos puede requerir una intervención.

Los PRM relacionados directamente con la terapia anticoagulante resultan más frecuentes en pacientes tratados con AVK que producen 3,0 frente a 1,4 PRM/RNM de los ACOD, siendo esto significativamente estadístico. Al haber más interacciones directamente con estos fármacos, los PRM moderados o graves son 1,20 mayores en estos casos, y en comparación con los ACOD puede requerir en más casos la derivación al MAP.

5. DISCUSIÓN

En el estudio realizado en la Comunidad de Castilla y León se ha observado que la mayoría de los pacientes tratados con ACOD los usan en la profilaxis de los riesgos asociados a fibrilación auricular y los pacientes con AVK los toman mayoritariamente para la prevención del tromboembolismo con cardiopatía detectada, pero lo cierto es que generalmente están indicados para el tratamiento y prevención de trombosis venosa y de fibrilación auricular.

Esta circunstancia se contrapone a las recomendaciones recogidas en el informe de posicionamiento terapéutico de la AEMPS, que muestra que el uso de AVK estaría indicado en nuevos pacientes con fibrilación auricular no valvular que necesiten terapia anticoagulante oral y principalmente en aquellos con afectación valvular, a diferencia de lo visto en nuestro estudio, donde se constata que cada vez se prescriben más ACOD. Esto es también coherente con los datos de consumo de anticoagulantes a nivel nacional, donde se observa que dos tercios de los pacientes sometidos a tratamiento con anticoagulantes orales lo hacen ya con fármacos de acción directa (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021; Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2016).

Sin embargo, el hecho de que cada vez más pacientes sean tratados con anti-coagulantes directos puede ser debido a varios factores. Por un lado, la evidencia disponible en los ensayos clínicos y observacionales realizados indica que el riesgo de hemorragia intracraneal es mayor en AVK que en ACOD, mientras que éstos presentan más hemorragia gastrointestinal (especialmente el dabigatrán). Por otro lado, la mortalidad es más alta en los pacientes tratados con AVK, por el mayor

riesgo de efectos adversos e interacciones; este hecho es coherente con nuestros resultados en los que se registran más PRM/RNM moderados y graves derivados de la terapia con el anticoagulante (Connolly *et al.*, 2009; Giugliano *et al.*, 2013; López *et al.*; 2017; Patel *et al.*, 2019; Schulman *et al.*, 2014).

Otro aspecto que debe de ser tenido en cuenta al prescribir estos fármacos es que, a nivel económico, algunos estudios sugieren que para el sistema de salud español deben considerarse como opciones más rentables los ACOD frente a AVK para la prevención de ictus en pacientes con fibrilación auricular, dado que los costes indirectos asociados con menores ingresos hospitalarios, menor proporción de rehabilitación y la ausencia de requisitos de monitorización del INR probablemente compensen la carga económica que supone el mayor coste de los ACOD (Escobar-Cervantes *et al.*, 2022).

Desde el punto de vista de la intervención realizada, los resultados son muy similares a los recogidos por Gómez *et al.* en número de tratamientos y tipo de RNM, si bien el número de PRM/RNM recabados por paciente fue más bajo en ese trabajo debido a que en nuestro estudio hemos incluido uno de los grupos (pacientes anticoagulados) con mayor riesgo de producir una interacción o una reacción adversa, especialmente los AVK (3 por paciente) (Gómez *et al.*, 2009). El PRM más frecuente en nuestro trabajo fue la interacción, al igual que en los datos analizados por Hämmerlei en un trabajo realizado en farmacias comunitarias de Alemania (Hämmerlein *et al.*, 2007).

En lo que se refiere a la intervención propuesta, en un 34 % de los casos se recomienda la intervención del MAP aunque sólo en el 3 % de los casos se propone un cambio en el tratamiento; estos datos son similares a los recabados en un estudio realizado en 112 farmacias comunitarias de distintos países europeos (Austria, Dinamarca, Alemania, Holanda, Portugal y España) en las que en un 26 % de las intervenciones propuestas por el farmacéutico se derivaba al paciente al MAP (Paulino *et al.*, 2004). En un trabajo realizado en Australia en 186 farmacias comunitarias este porcentaje se incrementaba a un 40 %, siendo los glucocorticoides, los AINE y los opioides los fármacos más afectados (Williams *et al.*, 2011).

Lo que es evidente en función de nuestros resultados es que los más de 10 PRM/RNM potenciales de este grupo de pacientes hace muy relevante la intervención y seguimiento por parte del farmacéutico comunitario, siendo especialmente importante en pacientes tratados con AVK y en los pacientes con diagnóstico de fibrilación auricular en los que los problemas son más frecuentes y graves al utilizar un número mayor de medicamentos.

6. CONCLUSIONES

- En nuestra muestra, la mayoría de los pacientes tratados con ACOD los usan preferentemente en la profilaxis de embolia y otros riesgos asociados a fibrilación auricular a pesar de las recomendaciones opuestas en este sentido.
- El número de PRM/RNM por paciente es de 10,15, un número muy alto, que deriva en 5,45 intervenciones potenciales, lo que indica que este tipo de pacientes debe ser un objetivo proactivo en los programas de atención farmacéutica.
- Los pacientes tratados con ACOD presentan 2,3 PRM/RNM más que los tratados con AVK, lo que deriva en más intervenciones potenciales, sin que la diferencia entre ambos sea significativa. Esto puede deberse al mayor número de tratamientos concomitantes por el tipo de diagnóstico.
- Sin embargo, cuando tenemos en cuenta sólo los PRM/RNM derivados de la terapia anticoagulante, los AVK producen 3,0 frente a 1,4 PRM/RNM derivados del consumo de ACOD, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Además, los pacientes tratados con AVK tienen 1,20 PRM/RNM moderados o graves más que los pacientes tratados con ACOD.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Web). Noviembre 2016. Informe de posicionamiento terapéutico. Criterios y recomendaciones generales para el uso de los anticoagulantes orales directos (ACOD) en la prevención del ictus y la embolia sistémica en pacientes con fibrilación auricular no valvular. Ref. UT_ACOD/V5/21112016.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Web). Enero 2021 Utilización de antitrombóticos en España. Ref. v.130319.
- Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A *et al.* Dabigatran versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2009 Sep 17; 361(12):1139-1151.
- Escobar Cervantes C, Martí-Almor J, Cabeza AIP, Bowrin K, Llorac Moix A, Genís Gironès M *et al.* Real-world cost-effectiveness analysis of NOACs versus VKA for stroke prevention in Spain. *PLoS One.* 2022; 17(4):e0266658.
- Foro de Atención Farmacéutica-Farmacia Comunitaria (Foro AF-FC). Guía práctica para los Servicios Profesionales Farmacéuticos Asistenciales en la Farmacia Comunitaria. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2019.
- Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL *et al.* Edoxaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2013 Nov 28; 369(22):2093-2104.

- Gómez MA, Villafaina A, Hernández J, Salgado RM, González MA, Rodríguez J *et al.* Promoting appropriate drug use through the application of the Spanish drug-related problem classification system in the primary care setting. *Ann Pharmacother.* 2009; 43(2):339-346.
- Granger CB, Alexander JH, McMurray JJV, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M *et al.* Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2011 Sep 15; 365(11):981-992.
- Hämmerlein A, Griese N, Schulz M. Survey of drug-related problems identified by community pharmacies. *Ann Pharmacother.* 2007; 41(11):1825-1832.
- López-López JA, Sterne JAC, Thom HHZ, Higgins JPT, Hingorani AD, Okoli GN *et al.* Oral anticoagulants for prevention of stroke in atrial fibrillation: systematic review, network meta-analysis, and cost effectiveness analysis. *BMJ.* 2017; 359:j5058.
- Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W *et al.* Rivaroxaban versus Warfarin in Nonvalvular Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2011 Sep 8; 365(10):883-891.
- Paulino EI, Bouvy ML, Gastelurrutia MA, Guerreiro M, Buurma H, ESCP-SIR Rejkjavik Community Pharmacy Research Group. Drug related problems identified by European community pharmacists in patients discharged from hospital. *Pharm World Sci [Internet].* 2004 [citado el 1 de febrero de 2023]; 26(6):353-360.
- Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Schellong S, Eriksson H, Baanstra D *et al.* Extended Use of Dabigatran, Warfarin, or Placebo in Venous Thromboembolism. *N Engl J Med.* 2013 Feb 21; 368(8):709-718.
- Treceño C, Jiménez MI. Manual de farmacología básica para ciencias de la salud. Valladolid: Servicio de publicaciones de la UEMC; 2019.
- Williams M, Peterson GM, Tenni PC, Bindoff IK, Curtain C, Hughes J *et al.* Drug-related problems detected in Australian Community Pharmacies: The PROMISE Trial. *Ann Pharmacother.* 2011; 45(9):1067-1076.

AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS CONTRA *Fasciola hepatica*

Advances in the Development of New Vaccines against Fasciola hepatica

Darío PERALLÓN MANTAS; Javier SÁNCHEZ MONTEJO; Antonio MURO ÁLVAREZ
Grupo de Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO). Instituto de
Investigaciones Biomédicas de Salamanca-Centro de Investigación de Enfermedades
Tropicales de la Universidad de Salamanca (IBSAL-CIETUS). Facultad de Farmacia.
Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, España.
ama@usal.es

RESUMEN: La fasciolosis es una zoonosis provocada por el trematodo *Fasciola hepatica* que afecta ampliamente al sector ganadero. Sin embargo, aún no se ha desarrollado una vacuna eficaz para evitar el contagio de este parásito.

En este trabajo se ha empleado la tecnología del ácido ribonucleico mensajero para desarrollar un transcrito de una proteína recombinante de *Fasciola hepatica* que podrá emplearse para completar la formulación de una posible vacuna.

Gracias al uso de plásmidos como vectores de clonación de la secuencia de nuestra proteína antigénica de interés, en el estudio transformaremos en cultivos bacterianos dicha proteína para su posterior transcripción.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*; vacuna; clonación; ARNm.

ABSTRACT: Fasciolosis is a zoonosis caused by the trematode *Fasciola hepatica* that widely affects the livestock sector. However, an effective vaccine has not yet been developed to prevent the spread of this parasite.

In this work, messenger ribonucleic acid technology has been used to develop a transcript of a recombinant protein of *Fasciola hepatica* that can be used to complete the formulation of a possible vaccine.

Thanks to the use of plasmids as cloning vectors of the sequence of our antigenic protein of interest, in the study we will transform this protein into bacterial cultures for later transcription.

Keywords: *Fasciola hepatica*; vaccine; cloning; mRNA.

1. INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica es un parásito del orden *Digenea* que pertenece a la clase *Trematoda*. Presenta una amplia distribución mundial y provoca importantes pérdidas económicas en el sector ganadero (Mas-Coma *et al.*, 2009). Al ser una zoonosis afecta también a las personas, siendo prevalente en algunos países del mundo (Howell *et al.*, 2015).

El estudio del proteoma del parásito nos permite identificar proteínas importantes para su supervivencia. Las FABP (*Fatty Acids Binding Proteins*) constituyen una familia multigénica de proteínas cuya función está asociada al transporte de ácidos grasos al interior del parásito. Algunas FABP nativas que se han empleado como antígenos vacunales, como Fh12, tienen el inconveniente de que son de difícil extracción del parásito (CDC, 2022). La solución ha sido el diseño de alternativas recombinantes, como Fh15, que ha demostrado en estudios previos una reducción del 76 % de trematodos en conejos infectados experimentalmente con *F. hepatica*, empleando el adyuvante de Freund (Muro *et al.*, 1997). Además, Fh15 ha demostrado protección cruzada contra *Schistosoma bovis* (López-Abán *et al.*, 2007).

Las vacunas de ARN mensajero (ARNm) son de reciente descubrimiento y están demostrando prometedores resultados. Instruyen a la célula para que cree en sus ribosomas proteínas que actuarán como antígenos vacunales, desencadenando respuesta inmunológica que lo neutralizará y generará memoria inmunológica (Deng *et al.*, 2022).

Para conseguir grandes cantidades de ARNm, habitualmente la secuencia de la proteína de interés se clona en un plásmido de ADN con un promotor de ARN polimerasa dependiente de ADN, como T7, aguas arriba a la secuencia de interés (Rong *et al.*, 1998). Además, estas secuencias incluyen regiones no traducidas que aseguran una alta estabilidad y traducibilidad del constructo (Jackson *et al.*, 2020). Tras la clonación, el vector de ADN se linealiza para que sirva de molde para la ARNm polimerasa que genere el transcrito. Posteriormente, el transcrito se encapsula en nanopartículas lipídicas que se inocularán para la inmunización (Zhang *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es la síntesis de ARNm codificante de la proteína de unión a ácidos grasos de *Fasciola hepatica*, denominada Fh15, como una nueva alternativa vacunal.

Para ello, planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar un vector de expresión de ARNm mediante herramientas bioinformáticas.
2. Clonar Fh15 en el vector diseñado.
3. Transcribir ARNm de Fh15 *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del vector de ARNm

Se diseñó un vector de expresión de ARNm utilizando los últimos avances en la tecnología ARNm disponibles (Deng *et al.*, 2022; Trepotec *et al.*, 2019). La secuencia se mandó sintetizar al servicio de biología molecular de la empresa NZYTech. Se obtuvo un plásmido de la familia pUC57 (Figura 1).

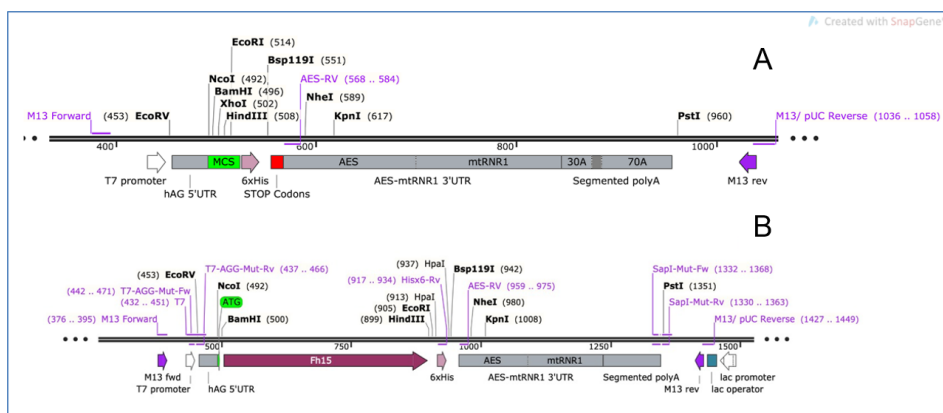


Figura 1: Vector de ARNm diseñado para vehicular la proteína de interés Fh15 (A). Se compone de: promotor T7; región UTR 5' hAG (*Alpha human globlin*) que garantiza una alta actividad de traducción, un MCS (*Multiple cloning site*) donde se incorporará Fh15 (B); una región UTR 3' con la secuencia AES-mtRNR1 que incrementa la estabilidad del ARN, y una cola de PolyA interrumpida por un conector corto (GCAUAU-GACU) que mejora la estabilidad del plásmido en *E. coli* (Deng *et al.*, 2022; Trepotec *et al.*, 2019).

3.2. Cultivos bacterianos

De forma rutinaria todas las cepas fueron cultivadas en el medio LB (*Lisogeny Broth*) (10 g/l peptona tríptica de caseína, 10 g/l NaCl y 5 g/l extracto de levadura, para cultivos líquidos o añadiendo 15 g/l de agar, para cultivos sólidos). Se utilizó ampicilina a 100 µg/ml como selección en las placas suplementadas con antibiótico.

Para la transformación se empleó el medio SOC (*Super Optimal broth + Catabolic repressor*) (20 g/l de peptona tríptica de caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 0.58 g/l de NaCl, 0.19 de g/l KCl). Posteriormente se añaden 2 mM de glucosa y 20 mM de Mg⁺ (a partir de una solución 2 M de MgSO₄ y MgCl₂) previamente esterilizados por filtración.

3.3 Clonación de la proteína *Fh15* en el vector de expresión *pUCEXP*

Se utilizaron técnicas de clonación estándar por ligación-restricción. Para ello se emplearon los kits Miniprep y Gelpure (NZYTech) para el aislamiento de plásmidos y purificación de fragmentos del gel, respectivamente. Las enzimas de restricción utilizadas fueron *Speedy NcoI* y *Speedy BamHI* (NZYTech). La ligasa fue *NZYTech T4 DNA ligase*. Todos los procesos fueron realizados según los protocolos establecidos por el fabricante.

3.4. Transformación

Se descongela en hielo un vial de células de *Escherichia coli* competentes con fenotipo DH5α e inmediatamente después se agregan 10 µL de la solución de ligación obtenida anteriormente, mezclando suavemente para evitar rupturas celulares. Se incuban las células en hielo durante 30 minutos y se les aplica un choque térmico durante 40 segundos en termobloque a 42 °C. Se coloca el vial en hielo durante 2 minutos. Después se agregan 0,9 mL de medio SOC a temperatura ambiente y se agita a 225 rpm durante 1 hora a 37 °C. Se siembran 100 µL de las células transformadas en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incuban 16 horas a 37 °C.

3.5. Técnicas para evaluar la construcción

3.5.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Se recogieron 8 colonias de los cultivos de *E. coli* transformadas con el vector de interés y se realiza PCR utilizando el *kit 2x PCR Master Solution (i-Taq)* de iNtRON Biotechnology.

3.5.2. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo por el “Servicio NUCLEUS: Secuenciación ADN, Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca” utilizando 300 µg de plásmido y 3,3 pmol de cebador. Se realizó la secuenciación utilizando el siguiente cebador: M13 Forward (GT^TTGTAAAACGACGGCCAGT).

3.6. Electroforesis

Se utilizaron geles de agarosa al 1 %. Para ello 40 mg de agarosa se disolvieron en 40 ml de TBE 0.5x [Tris (Roche) 450 mM ácido bórico (Sigma) 450 mM EDTA (Merck) 10 mM] y se añadieron 2µl de *Greensafe premium* (NZYTech) como agente intercalante. El ensayo se realizó durante 15 minutos a 60 V y 40 minutos más a 120 V.

Como marcador de peso molecular se utilizaron 2 µL de *NZYTech DNA ladder III*. Al resto de muestras se les añadió 1 µL de *NZYTech loading buffer 6x* por cada 5 µL.

Los geles de ARNm se realizaron en cubetas lavadas con inhibidores de ARNasas y se utilizó el marcador *RiboRuler* (Thermofisher). Se utilizaron 4 µL de una solución al 1 % de bromuro de etidio como agente intercalante. Las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 70 °C en presencia del tampón de carga proporcionado con el marcador de peso molecular.

3.7. Transcripción

Se cortó 1 µg de plásmido pUCEXP_Fh15 con la enzima *PstI* a 37 °C durante 15 minutos y se inactivó mediante calor durante 20 minutos a 80 °C. Se purificó el ADN cortado mediante el kit *Gelpure* de NZYTech. Las condiciones de transcripción fueron las establecidas en el kit *NZY T7 High Yield RNA Synthesis*.

A continuación, se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se añaden 2 µL de acetato de sodio 3M (Thermofisher) y 60 µL de etanol absoluto a -20 °C, dejando precipitar toda la noche a -80 °C. A la mañana siguiente se centrifuga 30 minutos a máxima velocidad a 4 °C. Se lava con etanol frío al 70 % sin resuspender el pellet. Se retira el etanol y se deja secar, antes de resuspenderlo en 20 µL de agua libre de nucleasas.

4. RESULTADOS

4.1. *Diseño del vector de clonación*

El plásmido diseñado se nombró pUCEXP. Se utilizó 1 μ L de plásmido para transformar la cepa DH5 α . Se recuperaron 6 colonias y se comprobó mediante PCR si contenían el vector, empleando los cebadores *M13 forward* y *AES reverse*.

Las 6 colonias mostraban una banda de aproximadamente 200 pb en la electroforesis de comprobación de la transformación de pUCEXP. Puesto que nuestra PCR debería tener una banda de 209 pb, asumimos que las 6 colonias contienen el vector deseado.

4.2. *Clonaje de la proteína Fh15 en el vector de expresión ARNm*

Se aisló pUCEXP de las colonias recuperadas y se realizó una restricción con las enzimas NcoI y BamHI. También se digirió el inserto Fh15 con dichas enzimas. Se corrió un gel de agarosa con ambas digestiones y se purificaron las bandas correspondientes a 400 pb para Fh15 y 3200 pb para pUCEXP. Se realizó la ligación de ambos fragmentos y 10 μ L de esta se utilizaron para transformar la cepa DH5 α , sembrándose las colonias en agar LB con ampicilina.

Las colonias resultantes del proceso fueron recogidas y comprobadas mediante PCR utilizando los cebadores *M13 forward* y *AES reverse*. Se analizaron 8 colonias, de las cuales 5 tenían la banda deseada (600 pb) y no presentaban ninguna banda no deseada (Figura 2).

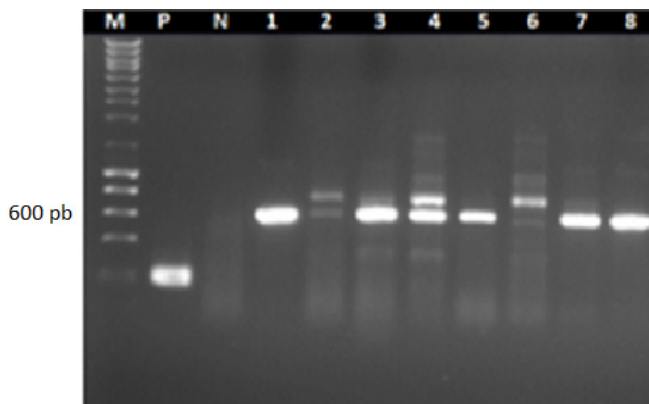


Figura 2. Gel de electroforesis de comprobación de Fh15 insertada en pUCEXP. El carril “M” corresponde al marcador de peso molecular NZYLadder III. El carril “P” al control positivo, pUCEXP sin inserto. El carril “N” es el control negativo (agua). Y los 8 pocillos restantes corresponden a las colonias sospechosas de portar el vector pUCEXP con el inserto.

Se aisló el plásmido de una de las cinco colonias mediante el kit Miniprep (NZYTech) y se enviaron a secuenciar, obteniendo un total de 546 pb con un 100 % de identidad a la secuencia esperada para la colonia seleccionada.

4.3. Obtención de ARNm mediante transcripción *in vitro*

El plásmido procedente de la cepa secuenciada se aisló en grandes cantidades y se linealizó mediante la enzima de restricción *Pst*I. Se realizó un proceso de transcripción *in vitro* con la polimerasa del fago T7 y se corrió un gel de agarosa con 5 µL de ARNm. El transcrito tiene un tamaño de aproximadamente 1000 bases y presenta alta densidad en comparación con el control positivo, lo que nos señala que se ha conseguido transcribir alta cantidad (Figura 3).

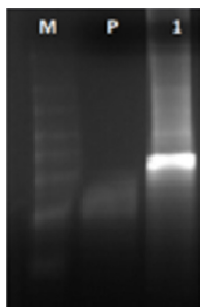


Figura 3. Gel de electroforesis de comprobación de la transcripción *in vitro* de Fh15. El pocillo “M” corresponde al marcador *RiboRuler* de Thermofisher. El pocillo “P” corresponde al control positivo del kit. El pocillo “1” corresponde al transcrito de Fh15.

5. DISCUSIÓN

La pandemia de SARS-CoV-2 nos ha enseñado que las nuevas vacunas de ARNm pueden constituir una nueva generación de vacunas útiles en las enfermedades producidas por trematodos. En este estudio se pretende dar un paso inicial para desarrollar una vacuna eficaz frente a *F. hepatica*. Para ello se ha diseñado un plásmido vector, denominado pUCEXP, basado en la tecnología descrita por BioNTech (Beissert *et al.*, 2020). En principio utilizamos una molécula de unión a ácidos grasos denominada FABP y que ha sido utilizada previamente por nuestro grupo de investigación como vacuna recombinante (Beissert *et al.*, 2020; Rodríguez-Pérez *et al.*, 1992). Los resultados muestran el exitoso proceso de clonación, comprobado mediante técnicas de PCR y posterior secuenciación. Además, hemos logrado transcribir altas cantidades de Fh15 *in vitro* a ARNm

que, con la adecuada formulación en nanopartículas lipídicas, se utilizará en un futuro como formulación vacunal en modelo murino de infección con *F. hepatica*. Se pretende que esta nueva tecnología de ARNm aporte mejores resultados vacunales que los obtenidos previamente.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado un vector de expresión de ARNm mediante herramientas bioinformáticas y los últimos conocimientos disponibles de tecnología de ARNm, cuya función es producir altas cantidades de la proteína de interés en células de mamífero.
2. Se ha clonado con éxito la proteína Fh15 en el vector diseñado y hemos comprobado su secuencia.
3. Se ha expresado Fh15 en forma de ARNm mediante transcripción *in vitro* con la polimerasa del fago T7 y comprobado su integridad por medio de electroforesis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Beissert T, Perkovic M, Vogel A, Erbar S, Walzer K, Hempel T *et al.* A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Molecular Therap.* 2020; 28: 119-128.
- CDC-Centers for Disease Control and Diseases. Fascioliasis. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. 2022 [última revisión 2 mayo 2019; citado 27 junio 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
- Deng Z, Tian Y, Song J, An G, Yang P. mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2022; 13: 1-6
- Howell A, Baylis M, Smith R, Pinchbeck G, Williams D. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine.* 2015; 121: 41-48.
- Jackson N, Kester K, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *npj Vaccines.* 2020; 11: 1-5.
- López-Abán J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez-Baños P *et al.* Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Veterinary Parasitology.* 2007; 145(3-4): 287-296.
- Mas-Coma S, Valero M, Bargues M. Chapter 2 *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology.* 2009; 69: 41-146.

- Muro A, Ramajo V, López J, Simón F, Hillyer G. Fasciola hepatica: Vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Veterinary*. 1997; 69(3-4): 219-229
- Rodríguez-Pérez J, Rodríguez-Medina J, García-Blanco M, Hillyer G. Fasciola hepatica: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein. *Experimental Parasitology*. 1992; 74(4): 400-407.
- Rong M, He B, McAllister W, Durbin R. Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95 (2): 515-519.
- Trepotec Z, Geiger J, Plank C, Aneja M, Rudolph C. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life. *RNA*. 2019; 25(4): 507-518.
- Zhang Q, Honko A, Zhou J, Gong H, Downs S, Vasquez J *et al.* Cellular Nanosponges Inhibit SARS-CoV-2 Infectivity. *Nano Letters*. 2020; 20 (7): 5570-5574.

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2023815973>

VALORACIÓN DE CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y COMPORTAMIENTOS SOBRE LAS VACUNAS EN LA POBLACIÓN

Evaluation of Knowledge, Attitudes and Behaviours about Vaccines in the Population

Ángela PÉREZ SANCHO; Ramona MATEOS CAMPOS*

Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Área Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno.

*Correo-e: rmateos@usal.es

RESUMEN: El conocimiento científico es el principal condicionante de las actitudes y comportamientos adquiridos por la población ante las vacunas. Se ha realizado un estudio observacional que evalúa cuáles han sido los conocimientos científicos sobre las vacunas que la población ha adquirido durante la pandemia del COVID-19. En base a esto se ha podido observar cómo condicionan los comportamientos que tiene la población. La “infodemia” generada durante la COVID-19 ha derivado en una población que posee demasiados términos científicos sobre vacunas, pero que no alcanza a comprenderlos. La Salud Pública está en manos de quien tiene el poder divulgativo, elijamos bien quién posee dicho poder.

Palabras clave: vacunas; COVID-19; conocimientos; comportamientos; actitudes.

ABSTRACT: Scientific knowledge is the main determinant of the skills and behaviors acquired by the population in relation to vaccines. An observational study has been carried out to evaluate the scientific knowledge about vaccines that the population has acquired during the

COVID-19 pandemic. On this basis, it has been possible to observe how it has conditioned the behavior of the population. The ‘infodemic’ generated during COVID-19 has resulted in a population that possesses too many scientific terms about vaccines but is unable to understand them. Public Health is in the hands of those who have the informative power, we should choose well who has this power.

Keywords: vaccines; COVID-19; knowledges; behaviours; attitudes.

1. INTRODUCCIÓN

Inmersos en un mundo de teléfonos móviles, ordenadores e incluso relojes inteligentes con acceso ilimitado a la información, la Salud Pública está en manos del que tenga poder divulgativo. Nuestra sociedad no padece de falta de información sanitaria, sino del exceso de esta, también conocido como infodemia, término que hace referencia a la cantidad excesiva de información creada sobre una materia (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

Durante los dos últimos años, con la llegada del SARS-2-COVID-19 las vacunas han sido objeto de numerosas noticias, publicaciones, “fake news” y titulares a nivel mundial. Desembocando así en una gran dificultad para obtener una fuente fidedigna de información sobre las vacunas y, en consecuencia, un fuerte desconocimiento científico de éstas.

2. OBJETIVOS

2.1. *General*

Evaluar los conocimientos, actitudes y comportamientos de la población ante las vacunas.

2.2. *Específicos*

- 1) Valorar los conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas según el sexo.
- 2) Conocer, según la edad, los conocimientos, actitudes y comportamientos de la población sobre las vacunas.
- 3) Determinar los conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas según el nivel de estudios.
- 4) Evaluar los conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas de la muestra en función de si son o no personal sanitario.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Diseño del estudio*

Se ha realizado un estudio epidemiológico observacional descriptivo y transversal entre el 12 de marzo de 2022 y el 15 de mayo del 2022.

3.2. *Población*

En el estudio han participado 430 sujetos mayores de 18 años residentes en España.

3.3. *Fuente de datos*

La información se recoge mediante la aplicación de un cuestionario. Con el fin de confeccionarlo se ejecutó una búsqueda inicial en PubMed usando como palabras clave “vaccine”, “public health”, “knowledge”, “hesitancy” o “attitude”.

Asimismo, se han consultado numerosos reportajes televisivos sobre vacunas creados durante la pandemia, además de diversas noticias en periódicos web y redes sociales que se publican cada día.

3.4. *Formato del cuestionario*

El cuestionario realizado a la población se estructura en cuatro títulos, que facilitan la compilación del mismo, éstos son:

- 1) Perfil del encuestado
- 2) Demuestra todos tus conocimientos sobre vacunas
- 3) Actitudes tomadas frente a las vacunas
- 4) Comportamientos de la población

Desde el punto de vista epidemiológico se han recogido las siguientes variables:

1. **Variables independientes:**

- a. Sexo
- b. Rango de edad
- c. Nivel de estudios
- d. Área profesional

2. **Variables dependientes:**

- a. Conocimientos científicos sobre vacunas

- b. Importancia dada por la población a las vacunas
- c. Eficacia de las vacunas frente al COVID-19
- d. Fuente de información sobre vacunas
- e. Comportamiento proactivo a la vacunación
- f. Vacunación en menores

3.5. *Estudio piloto*

Se aplicó el cuestionario a 15 personas, de diferentes perfiles académicos, que hicieron diferentes sugerencias con el fin de obtener el cuestionario definitivo (Anexo 1).

3.6. *Aplicación del cuestionario*

La plataforma seleccionada con el fin de hacer llegar el cuestionario a la mayor parte de población posible fue *Google Forms*; ésta permite hacerlo anónimo, descargar las respuestas y es gratuita. El cuestionario definitivo se podía responder en el siguiente enlace: <https://forms.gle/378JcY9HfqKRhiCu5>. Dicho enlace se difundió a través de redes sociales y WhatsApp, fundamentalmente.

3.7. *Análisis de los resultados*

Las respuestas del cuestionario se exportaron a Microsoft Excel, herramienta utilizada para analizar los resultados, elaborar las tablas y figuras. A partir de esta hoja de cálculo se han obtenido los resultados expresados en frecuencia (N) y porcentaje (%). Las diferencias entre variables se analizan mediante el estadístico “chi cuadrado” y el nivel de significación, p .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. *Características generales de la muestra*

Las mujeres representan el 57 % de la muestra.

La mayor parte de los participantes, el 60 %, tiene entre 18-29 años. Solo el 5 % tienen 65 o más años, esto es probable que se deba al formato online de la encuesta.

Se propuso como variable independiente el nivel de estudios. Fueron graduados, licenciados y doctorados los que mostraron una mayor colaboración en la encuesta.

El 66 % de la muestra no practica una profesión relacionada con el área de la Salud, así podremos observar los conocimientos obtenidos a través de medios,

redes sociales y el boca a boca. Analizaremos cómo afecta esto a su comportamiento de vacunación.

4.2. Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas

4.2.1. Conocimientos

La Tabla 2 recoge las preguntas que valoran el nivel de conocimientos sobre vacunas de la población.

El 78 % de la muestra conoce la utilidad científica de las vacunas (Tabla 1).

El 47 % cree que las vacunas solo evitan enfermedades causadas por virus, puede que se deba a la última campaña de vacunación contra el virus de la COVID-19. Se observa la repercusión que han tenido las vacunas víricas en los medios de información, olvidando la importancia de las vacunas contra bacterias como las del meningococo B, difteria, tétanos o tosferina (HSS, 2021) (Tabla 1).

El 75 % de los sujetos conocen la composición de las vacunas (Tabla 1).

El 65 % contestó correctamente que las vacunas se usan como tratamiento preventivo (Tabla 1).

Siendo la vacunación completamente voluntaria, el 35 % contestó que ésta es voluntaria u obligatoria en función de la vacuna. Vacunarse frente a la COVID-19 ha podido parecer obligatorio, ya que los organismos gubernamentales han querido promover dicha campaña limitando de privilegios sociales a los no vacunados (Real Decreto-Ley 30/2021) (Tabla 1).

Aunque el 91 % de los individuos conoce la definición científica de “inmunidad colectiva” sigue habiendo un 6 % que cree que se trata de la vacunación en masa (Tabla 1).

Podemos resaltar positivamente que el 99 % de la población sabe que las vacunas están indicadas en toda la población (Tabla 1).

Sin embargo, el 8 % cree que están contraindicadas en embarazadas y el 13 % cree lo están en inmunodeprimidos. Ciertas vacunas no están recomendadas en algún trimestre del embarazo, pero existen vacunas alternativas, al igual que para los inmunodeprimidos (Tabla 1) (Sebghati *et al.*, 2021).

Los enfermos crónicos deben llevar su vacunación al día, ya que están más expuestos a enfermar gravemente de no hacerlo. En este caso, el 43 % de encuestados considera oportuna la supervisión del médico (Tabla 1).

El motivo científico por el que nos vacunamos en los primeros años de vida es conocido por el 72 % de la población (Tabla 1).

4.2.2. Actitudes

Los conocimientos conforman la actitud que tiene nuestra población sobre las vacunas.

A pesar de que el 78 % de los encuestados conocen su utilidad, solo el 50 % de la muestra las considera las medidas sanitarias que mayor beneficio tienen en Salud Pública. El otro 48 % las considera bastante importantes, lo cual también podemos considerar como una buena actitud. Hay un 1 % que no cree en su eficacia o las juzga como inútiles (Tabla 2).

Solo el 8 % duda de su eficacia, esto puede que esté condicionado por la buena repercusión de la vacuna contra la COVID-19, que ha demostrado dicha eficacia con hechos (Redacción Medica, 2021) (Tabla 2).

La vacunación es un tema de interés general no solo sanitario, el 81 % de los encuestados está interesado en aprender más (Tabla 2) (Organización mundial de la Salud, 2021).

El 94 % de los individuos considera que vacunarse protege al resto de la población (Tabla 2).

El 71 % de la población asegura haber sufrido síntomas leves tras vacunarse y solo un 3 % ha tenido efectos adversos graves ante la vacunación, porcentaje mínimo si tenemos en cuenta todos sus beneficios (Tabla 2) (Spencer *et al.*, 2017).

Antes de la puesta en marcha de las campañas de vacunación frente a la infección por COVID-19, el 49 % de los participantes consideraban que la vacuna iba a ser importante y el 47 % pensaba que iba a ser la autora del fin de la pandemia. Alcanzando el final de la crisis de la COVID-19 solo el 97 % tachan la vacunación de importante o imprescindible, un 2 % se atreve a declarar que no ha servido para nada (Tabla 2).

El 37 % de la población encuestada ha obtenido la información que posee sobre vacunas de la TV o redes sociales. Solo el 18 % la obtiene de fuentes fiables en las que está regulada su veracidad, como lo son los libros y artículos científicos. Teniendo en cuenta las fuentes de información de la población cabe destacar que el 79 % considera dicha fuente fiable. El 53 % de los que han seleccionado TV, redes sociales o “del boca a boca” como fuente de información la consideran fiable (Tabla 2).

4.2.3. Comportamientos

Los conocimientos y actitudes condicionan el comportamiento que tiene la población a la hora de decidir si vacunarse.

El 90 % de la población participa en las campañas de vacunación. A pesar de las evidencias científicas de la efectividad de las vacunas hay un sorprendente 10 % que decide no vacunarse (Tabla 3).

El 10 % afirma no vacunarse nunca, pero solo un 3 % no está vacunado frente a la COVID-19. Deducimos que las medidas restrictivas del Gobierno ante los no vacunados han logrado que el 7 % de población que no se suele vacunar haya participado en dicha campaña (Tabla 3).

El 79 % cumple el calendario vacunal al completo. El 54 % de la población conoce el calendario vacunal infantil (Tabla 3).

El 72 % de la población conoce la razón científica por la que somos vacunados en la infancia, sin embargo, solo el 67 % considera estar bien informado sobre los motivos. Puede que escuchen la razón científica en los medios, pero no alcancen a comprenderla.

El 12 % de la población con menores a su cargo decidió no vacunarlos, de estos un sorprendente 48 % dice que su decisión se basa en estudios científicos (Tabla 3).

Tomamos como filtro los conocimientos científicos correctos demostrados en las preguntas 5, 6, 7, 10 y 14. Solo 96 personas de las 430 que respondieron contestaron a ellas correctamente. La mayor parte de encuestados que estaban en lo correcto son mujeres de entre 18-29 años.

Si tenemos en cuenta los conocimientos científicos correctos en función del área profesional, observamos que solo han contestado bien un 41 % del total de profesionales sanitarios que se enfrentaron a la encuesta, representan el 63 % de los que están en lo correcto.

Solo el 22 % de los encuestados tienen conocimientos científicos suficientes sobre vacunas (Horcajada *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

- 1) La población entre 18 y 29 años es la que tiene mayor conocimiento científico sobre vacunas y es similar en ambos sexos.
- 2) Una parte de la población considera saber mucho sobre vacunas, sin embargo, la información que poseen es incorrecta, incluyendo el personal sanitario.
- 3) Una proporción importante de personas se informan a través de TV, redes sociales o del “boca a boca”, que no son siempre fuentes fiables.
- 4) El porcentaje de población que duda de la eficacia de las vacunas es similar al que decide no vacunarse.

- 5) Casi toda la población vacuna a los menores a su cargo, sin embargo, la mitad de los que deciden NO vacunar a los menores, lo hacen en base a estudios científicos.
- 6) Solo un quinto de la población tiene suficientes conocimientos científicos sobre vacunas.
- 7) Los medios de comunicación se han centrado tanto en la COVID-19 que han dejado de lado la importancia de las vacunas ante otras enfermedades, aumentando así los índices de vacunación solo ante esta infección.
- 8) La “infodemia” generada durante la COVID-19 ha derivado en una población que posee demasiados términos científicos sobre vacunas, pero que no alcanza a comprenderlos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- U.S. Department of Health & Human Services. (n.d.). Tipos de vacunas [Types of vaccines]. Retrieved April 10, 2022, from <https://www.hhs.gov/es/immunization/basics/types/index.html>
- Horcajada MM, Cercó CA, Costas RQ, Carrizo AC, Sero EE, Del Moral RL. Evaluación del conocimiento y administración de vacunas en población adolescente y adulta en la farmacia comunitaria. *Farmacéuticos Comunitarios*. 2018; 10(Suplemento 1):153.
- Real Decreto-Ley 30/2021, de 23 de diciembre, por el que se adoptan medidas urgentes de prevención y contención para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19. *Boletín Oficial del Estado*, 23 de diciembre de 2021; número 307.
- Redacción Médica. (2021, April 22). España, 9º país europeo que más confía en las vacunas Covid [Spain, 9th European country with the most trust in Covid vaccines]. Retrieved April 30, 2022, from <https://www.redaccionmedica.com/secciones/sanidad-hoy/espasa-9-pais-europeo-que-mas-confia-en-las-vacunas-covid-6968>.
- Sebghati M, Khalil A. Uptake of vaccination in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 2021; 76:53-65.
- Spencer JP, Trondsen Pawlowski RH, Thomas S. Vaccine Adverse Events: Separating Myth from Reality. *Am Fam Physician*. 2017; 95(12):786-794.
- World Health Organization. (n.d.). Vacunas e inmunización: ¿Qué es la vacunación? [Vaccines and immunization: What is vaccination?]. Retrieved April, 2022, from <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination>
- Pan American Health Organization. (2020). Infodemia y COVID-19 [Infodemic and COVID-19]. Retrieved April 19, 2023, from https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52053/Factsheet-Infodemic_spa.pdf?sequence=16.

7. ANEXO

TABLA 1. Frecuencia de las respuestas sobre los conocimientos

¿Sabe usted para qué sirven las vacunas?	N Frecuencia	% Porcentaje
Prevención de enfermedades graves/mortales y refuerzo del sistema inmunitario	337	78,37
Prevención de enfermedades graves/mortales	34	7,91
Prevención de enfermedades leves	1	0,23
Refuerzo del sistema inmunitario	58	13,49
Total general	430	100,00
¿Sabe usted qué enfermedades evitan las vacunas?	N Frecuencia	% Porcentaje
Enfermedades causadas por bacterias	8	1,86
Enfermedades causadas por virus	202	47,09
Enfermedades causadas tanto por virus como por bacterias	182	42,42
No evitan ninguna enfermedad	37	8,62
Total general	429	100,00
¿Cuál es la composición de las vacunas?	N Frecuencia	% Porcentaje
Están compuestas de gérmenes vivos	63	14,72
Están compuestas de microchips para vigilarnos	2	0,47
No lo sé	44	10,28
Pueden estar compuestas de gérmenes vivos, muertos, toxoides o subunidades	319	74,53
Total general	428	100,00
Las vacunas se usan solo como tratamiento preventivo:	N Frecuencia	% Porcentaje
No	150	35,46
Sí	273	64,54
Total general	423	100,00

ÁNGELA PÉREZ SANCHO Y RAMONA MATEOS CAMPOS
VALORACIÓN DE CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y COMPORTAMIENTOS
SOBRE LAS VACUNAS EN LA POBLACIÓN

La vacunación es de carácter:	N Frecuencia	% Porcentaje
Depende de qué enfermedad se trate	152	35,35
Obligatoria en nuestro país	13	3,02
Obligatoria en todo el mundo	3	0,70
Voluntaria	262	60,93
Total general	430	100,00
El significado de inmunidad colectiva es:	N Frecuencia	% Porcentaje
Contagio masivo	5	1,17
No lo he oído nunca	7	1,63
Población protegida indirectamente ante la propagación de una enfermedad infecciosa gracias a la vacunación o al contagio previo	392	91,38
Vacunación en masa	25	5,83
Total general	429	100,00
Para qué grupos de población están indicadas las vacunas:	N Frecuencia	% Porcentaje
Solo en la infancia	1	0,23
Solo en personas inmunodeprimidas	2	0,47
Toda la población	427	99,30
Total general	430	100,00
Para qué grupos de población están contraindicadas las vacunas:	N Frecuencia	% Porcentaje
En embarazadas	32	7,53
En enfermos crónicos (cardiovasculares, pulmonares, diabetes)	14	3,29
En inmunodeprimidos	57	13,41
En ninguno, salvo excepciones	322	75,76
Total general	425	100,00

ÁNGELA PÉREZ SANCHO Y RAMONA MATEOS CAMPOS
VALORACIÓN DE CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y COMPORTAMIENTOS
SOBRE LAS VACUNAS EN LA POBLACIÓN

¿Sabe si las personas con enfermedades (cardiovasculares, pulmonares, diabetes .) pueden/ deben vacunarse?	N Frecuencia	% Porcentaje
Depende de la vacuna	116	27,42
Sí, siempre	47	11,11
Solo bajo la supervisión del médico	182	43,03
Toda la población se puede vacunar	78	18,44
Total general	423	100,00
¿Sabe usted el motivo por el que somos vacunados en los primeros años de vida?	N Frecuencia	% Porcentaje
Porque de mayores ya somos inmunes contra todas las enfermedades	4	0,93
Porque nuestro sistema inmune aún no se ha desarrollado, evitan riesgo de que enfermen gravemente	306	71,50
Porque nuestro sistema inmune aún no se ha desarrollado	55	12,85
Porque retrasar el momento de vacunarnos es correr el riesgo de enfermar gravemente	63	14,72
Total general	428	100,00

TABLA 2. Frecuencia de respuestas ante las preguntas de actitudes

¿Qué importancia tienen para usted las vacunas?	N Frecuencia	% Porcentaje
Considero que son bastante importantes	206	48,24
No creo en su eficacia, son un timo	2	0,47
Si no nos vacunásemos estaríamos más sanos	2	0,47
Son las medidas sanitarias que mayor beneficio tienen en salud pública	217	50,82
Total general	427	100,00

ÁNGELA PÉREZ SANCHO Y RAMONA MATEOS CAMPOS
VALORACIÓN DE CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y COMPORTAMIENTOS
SOBRE LAS VACUNAS EN LA POBLACIÓN

¿Duda usted de la eficacia de las vacunas?	N Frecuencia	% Porcentaje
No	395	92,07
Sí	34	7,93
Total general	429	100,00
¿Considera que necesita más información específica sobre vacunas para comprender su verdadera utilidad?	N Frecuencia	% Porcentaje
Con lo que conozco me vale	70	16,39
No me interesa	13	3,04
Sí, no me vendría mal	155	36,30
Sí, siempre que puedo amplio mis conocimientos	189	44,26
Total general	427	100,00
¿Considera que vacunarse protege al resto de la población?	N Frecuencia	% Porcentaje
No me lo he planteado	7	1,64
No sirve para nada	5	1,17
Sí, evita que la enfermedad se propague	403	94,16
Sí, pero no comprendo el motivo	13	3,04
Total general	428	100,00
Ha sufrido algún efecto secundario asociado a la administración de una vacuna	N Frecuencia	% Porcentaje
No porque nunca me he vacunado	2	0,47
No, nunca	110	25,64
Sí, grave	13	3,03
Sí, leve	304	70,86
Total general	429	100,00

ÁNGELA PÉREZ SANCHO Y RAMONA MATEOS CAMPOS
VALORACIÓN DE CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y COMPORTAMIENTOS
SOBRE LAS VACUNAS EN LA POBLACIÓN

Durante la crisis de la infección COVID-19, ¿consideraba importante la llegada de la vacuna?	N Frecuencia	% Porcentaje
Mucho, esperaba que trajese el fin de la pandemia	199	46,50
No entendía muy bien qué consecuencias tendría	14	3,27
No le di importancia	5	1,17
Sí, lo consideraba importante	210	49,07
Total general	428	100,00
¿Considera que la vacuna frente a la infección COVID-19 ha sido imprescindible para controlar la pandemia?	N Frecuencia	% Porcentaje
Ha ayudado mucho	244	57,01
La vacuna no ha servido de nada	8	1,87
No me lo he planteado	6	1,40
Sí, gracias a ella salimos del confinamiento	170	39,72
Total general	428	100,00
Fuente de la que ha obtenido la mayor parte de la información que posee sobre vacunas:	N Frecuencia	% Porcentaje
Boca a boca	24	5,59
Educación (universitaria, colegios, cursos)	170	39,63
Libros/artículos	78	18,18
Televisión/redes sociales	157	36,60
Total general	429	100,00
Considera que dicha fuente de información es fiable:	N Frecuencia	% Porcentaje
No	89	20,79
Sí	339	79,21
Total general	428	100,00

TABLA 3. Frecuencia de respuestas ante las preguntas de comportamientos

¿Participa usted en las campañas de vacunación?	N Frecuencia	% Porcentaje
Depende de qué enfermedad se trate	80	18,78
Nunca, ni me planteo hacerlo	43	10,09
Sí, cuando puedo	117	27,46
Sí, siempre	186	43,66
Total general	426	100,00
¿Ha sido usted vacunado frente a la COVID-19?	N Frecuencia	% Porcentaje
Sí	418	97,89
No	9	2,11
Total general	427	100,00
¿Cumple usted el calendario vacunal recomendado para su edad?	N Frecuencia	% Porcentaje
Claro, al completo	339	79,02
La verdad que no lo sé	59	13,75
Me falta una vacuna	28	6,53
No, nunca me he vacunado	3	0,70
Total general	429	100,00
¿Conoce el calendario vacunal recomendado para menores?	N Frecuencia	% Porcentaje
Sí	232	54,33
No	195	45,67
Total general	427	100,00
¿Considera estar bien informado sobre los motivos por los que se debe vacunar a los menores?	N Frecuencia	% Porcentaje
Sí	281	66,27
No	143	33,73
Total general	424	100,00

ÁNGELA PÉREZ SANCHO Y RAMONA MATEOS CAMPOS
 VALORACIÓN DE CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y COMPORTAMIENTOS
 SOBRE LAS VACUNAS EN LA POBLACIÓN

Si tiene/ha tenido hijos o menores a su cargo, ¿ha decidido/decidió que estos cumplan el calendario vacunal establecido por su comunidad autónoma?	N Frecuencia	% Porcentaje
Sí	235	88,01
No	32	11,99
Total general	267	100,00
Si tiene/ha tenido hijos o menores a su cargo, ha tomado/tomó la decisión de vacunarlos con base en:	N Frecuencia	% Porcentaje
Es lo que hace todo el mundo	35	13,11
Los estudios científicos	207	77,53
No pienso vacunarles por el bien de su salud	7	2,62
Tampoco me planteé si hacerlo	18	6,74
Total general	267	100,00

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2023817584>

DISTRIBUCIÓN DE PICADURAS DE GARRAPATAS RETIRADAS A PERSONAS DURANTE LA PANDEMIA DEL COVID-19 EN CASTILLA Y LEÓN

Distribution of Tick Bites Removed from People during the COVID-19 Pandemic in Castilla y León

Carlos RIVAS; Carmen VIEIRA; Antonio MURO

Facultad de Farmacia. Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola. Universidad de Salamanca. Licenciado Méndez Nieto. 37071 Salamanca

Correo-e: ama@usal.es

RESUMEN: Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de gran importancia a nivel mundial debido a su capacidad de transmitir agentes patógenos. En 2020, se produjo una pandemia mundial de SARS-CoV-2 que alteró el comportamiento humano y los ecosistemas de las garrapatas. El objetivo principal del trabajo es el estudio de la distribución de las garrapatas extraídas a personas en Castilla y León durante la pandemia de SARS-CoV-2 y su comparación con el año anterior y posterior. Se recibieron 5010 garrapatas extraídas a personas en los servicios de salud de la comunidad durante 2019, 2020 y 2021. En el laboratorio se procedió a su identificación y recogida de datos epidemiológicos del paciente picado para la posterior elaboración de una base de datos. Se realizó un análisis descriptivo de la comparación entre los periodos prepandemia, pandemia y postpandemia según variables divididas en tres clases: grupos poblacionales, especie de garrapata y distribución geográfica y temporal. De los resultados obtenidos en esta comparación se puede concluir que, mientras algunas variables se mantuvieron estables, la pandemia provocó alteraciones en el número de picaduras reportadas, en su distribución temporal y de especie y en la distribución de las picaduras en algunos grupos poblacionales.

Palabras clave: garrapata; epidemiología; Castilla y León; SARS-CoV-2; pandemia.

ABSTRACT: Ticks are hematophagous ectoparasites with great importance worldwide due to their capacity of pathogenic transmission. In 2020, a global SARS-CoV-2 pandemic occurred, altering human behavior and tick ecosystems. The aim of the study is to investigate the distribution of ticks extracted from humans in Castilla y León during the SARS-CoV-2 pandemic and its comparison with the previous and subsequent years. 5010 ticks extracted from people on community health centers were received during 2019, 2020 and 2021. In the laboratory, they were identified and the epidemiological data of the bitten patient was collected for the subsequent preparation of a database. A descriptive analysis between pre-pandemic, pandemic and post-pandemic periods was conducted according to variables divided into three classes: population groups, tick species and geographic and temporal distribution. From the results obtained in this comparison, it can be concluded that, while some variables remained stable, the pandemic caused changes in the number of reported bites, in their temporal and species distribution and in the distribution of bites in some population groups.

Keywords: tick; epidemiology; Castilla y León; SARS-CoV-2; pandemic.

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos hematófagos de distribución mundial pertenecientes al orden Ixodida, que consta a su vez de tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae. La familia Ixodidae es conocida comúnmente como “garrapatas duras”, mientras que las Argasidae serían las “garrapatas blandas”. La familia Nuttalliellidae sólo tiene una especie conocida (Estrada-Peña, 2015). Todas las garrapatas son parásitos obligados temporales de animales vertebrados. Presentan un cuerpo redondo sin divisiones denominado idiosoma y unas piezas bucales separadas de este denominadas gnathosoma o capítulo. Su ciclo vital está formado por tres fases evolutivas: larva, ninfa y adulto. El paso de una fase a la siguiente se produce tras la ingesta de sangre. Las familias Ixodidae y Argasidae presentan diferencias entre sí en cuanto a sus características fisiológicas, morfológicas y ciclo de vida (Estrada-Peña, 2015).

La familia Ixodidae, o “garrapatas duras”, tiene el capítulo localizado en la zona apical del idiosoma. Poseen un escudo dorsal en el que se basa el dimorfismo sexual acusado de esta familia: en las hembras el escudo cubre la mitad o un tercio del idiosoma, en los machos lo cubre por completo. Presentan placas espiculares

grandes y se alimentan de forma lenta, llegando a ingerir hasta 100 veces su peso. La familia Argasidae, o “garrapatas blandas”, tiene el capítulo localizado en la zona ventral del idiosoma, que está formado por un tegumento similar al cuero y carecen de dimorfismo sexual definido. Presenta placas espiculares pequeñas y se alimentan de forma rápida llegando a ingerir hasta 10 veces su peso. Tienen una gran importancia epidemiológica y clínica debido a su capacidad vectorial, pudiendo transmitir una gran variedad de patógenos a las personas. Además, también son de gran importancia desde el punto de vista veterinario, ya que anualmente se producen grandes pérdidas económicas en explotaciones ganaderas debido a enfermedades transmitidas por picaduras de garrapata (Rochlin y Toledo, 2020). La epidemiología de las garrapatas está intrínsecamente ligada a los factores ambientales, debido a que estos afectan de forma destacable a su comportamiento y ciclo vital. De manera general, se muestran más activas durante los meses de primavera, alcanzando su máxima actividad en verano. Durante el invierno, muchas especies de garrapata entran en un estado de hibernación conocido como diapausa (Estrada-Peña y De la Fuente, 2014).

Dentro de la comunidad autónoma de Castilla y León las garrapatas retiradas a personas pertenecen a cinco géneros: *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Dermacentor* y *Haemaphysalis*, que son potenciales vectores de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, varias genoespecies de *Rickettsia*, *Anaplasma phagocytophilum* y el virus de Crimea-Congo (Fernández, 2003). La media de garrapatas retiradas a personas en Castilla y León hasta el año 2019 oscilaba entre 1200 y 1600 al año (Vieira *et al.*, 2022).

Durante el año 2020, se produjo una situación anómala en España causada por la pandemia de SARS-CoV-2. Hubo un periodo de confinamiento (estancia obligada en domicilio, salvo excepciones) que se inició el 14 de marzo de 2020 y se prolongó hasta el 21 de junio del mismo año. Este periodo de cuarentena y la posterior adaptación a la existencia del virus ha provocado un cambio tanto en el comportamiento habitual de las personas como en los factores ambientales de los ecosistemas en los que habitan las garrapatas (Cheval *et al.*, 2020).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los cambios en el comportamiento de las personas y en los factores ambientales generados por la pandemia de SARS-CoV-2 podrían haber ocasionado un cambio en la distribución de las picaduras de garrapata que se retiran a personas en Castilla y León.

El *objetivo principal* del trabajo es el estudio de la distribución de las garrapatas extraídas a personas en Castilla y León durante la pandemia de SARS-CoV-2 y su comparación con el año anterior y posterior.

Objetivos específicos:

- Identificación de garrapatas retiradas a personas en los años 2019-2021.
- Estudio de la distribución geográfica, temporal y demográfica de las garrapatas extraídas a personas.
- Influencia de la pandemia causada por SARS-CoV-2 en la distribución de las picaduras de garrapata en los distintos grupos poblacionales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Muestras estudiadas*

A través del programa de control y prevención de antropozoonosis transmitidas por garrapatas en Castilla y León, las garrapatas extraídas a personas en los centros de salud y hospitales de la comunidad autónoma de Castilla y León son enviadas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, con la finalidad de su identificación y su posterior análisis molecular para la detección de microorganismos que puedan ser transmitidos. En este estudio se recogen los siguientes datos epidemiológicos: edad y sexo del paciente, localización geográfica donde le ha picado la garrapata, así como lugar anatómico en el que ha sido extraída. Durante los años 2019, 2020 y 2021 se han recibido un total de 5010 garrapatas extraídas de personas, representando espacios temporales de prepandemia, pandemia y postpandemia.

3.2. *Métodos y claves de identificación morfológica en garrapatas*

Cada garrapata es identificada morfológicamente de forma individual tanto a nivel de especie como de estadio, mediante el uso de lentes binoculares y claves taxonómicas de referencia (Apanaskevich, 2008; Estrada-Peña *et al.*, 2004; Gil-Collado *et al.*, 1979; Estrada-Peña *et al.*, 2017). También se determina el sexo de la garrapata y su grado de alimentación.

3.3. *Método de análisis*

Se ha optado por utilizar un análisis de tipo descriptivo para la realización del estudio, debido a la utilidad de esta metodología para poder sistematizar y facilitar las características y distribución de un fenómeno dentro de una población de estudio. Debido a la naturaleza de este tipo de análisis, sólo es posible la elaboración de hipótesis que deberán ser aceptadas o rechazadas con un análisis estadístico posterior (Vega de Cabo *et al.*, 2008).

Se han analizado los datos obtenidos de los reportes de picaduras respecto a variables relacionadas con tres áreas: los diferentes grupos poblacionales, la especie a la que corresponden las garrapatas extraídas y su distribución geográfica. Para ello, se han obtenido las frecuencias absolutas de las variables estudiadas, y se han elaborado tablas, figuras y mapas con los datos obtenidos para su análisis posterior. Se han desechado los que no se ha especificado un valor concreto para la variable estudiada en cada caso.

4. RESULTADOS

4.1. Distribución geográfica y temporal

La distribución mensual de las garrapatas durante los tres años de estudio siguió el patrón típico ya descrito: en invierno el número de picaduras es muy bajo, mientras que el pico de mayor actividad corresponde a los meses de abril, mayo y junio. Como se puede apreciar en la Figura 1, se produjo una reducción importante de la cantidad de garrapatas extraídas de personas en los meses de marzo y abril de 2020, coincidiendo con el periodo de confinamiento estricto. Cabe destacar que, en el periodo de mayo a julio de 2021, se reducen notablemente durante el mes de junio y presentan altos valores en mayo y julio, difiriendo de la distribución obtenida en los dos años anteriores.

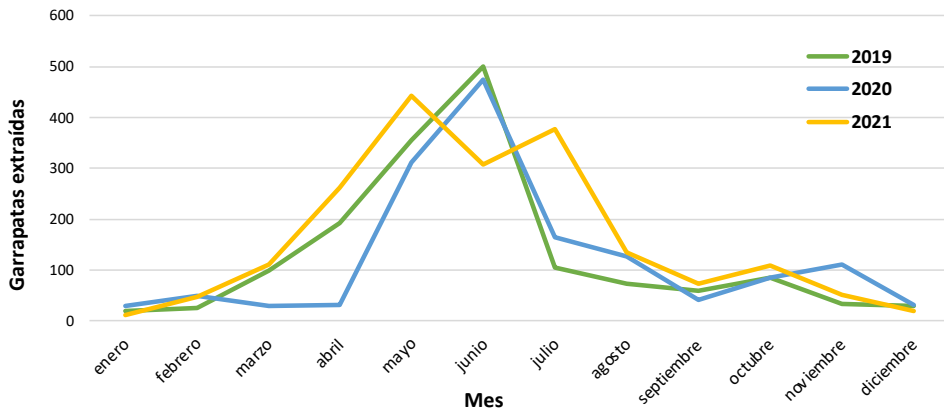


Figura 1. Distribución de las garrapatas extraídas según mes y año.

Si analizamos el número de garrapatas extraídas por provincia, se observan variaciones durante los tres años estudiados. El número ha aumentado de forma progresiva en Soria y Valladolid desde el año 2019. En León disminuyeron ligeramente en 2020, incrementándose ampliamente en 2021. En el caso de Salamanca,

Ávila y Segovia hay una disminución puntual en 2020 respecto a 2019, volviendo a números similares en 2021. En Zamora y Palencia se produce un aumento en 2020 respecto a 2019, que se reduce en 2021, pero se mantiene por encima del primer año estudiado. En Burgos disminuye el número de picaduras de 2019 a 2020 y aumenta en 2021, sin llegar a valores de 2019.

Las garrapatas extraídas de personas son enviadas mayoritariamente desde centros de salud rurales, excepto en Burgos, donde el número de garrapatas es mayor en las zonas urbanas desde el inicio, y en Valladolid, donde se produjo un cambio de tendencia en el año 2021 con más extracciones en zonas urbanas que rurales.

4.2. Distribución por especie

Se analizaron un total de 5407 garrapatas a lo largo de los tres años, de las cuales 427 no pudieron ser identificadas hasta el nivel de especie. De las 4980 restantes, 1600 se recibieron en 2019, 1489 en 2020 y 1890 en 2021. *I. ricinus* fue la especie más frecuentemente retirada de personas (46,72 %), seguida por *R. bursa* (16,27 %), *H. marginatum* (11,49 %), *D. marginatus* (7,63 %), *H. lusitanicum* (7,41 %), Complejo *R. sanguineus* (6,27 %), *D. reticulatus* (2,59 %) y *H. punctata* (1,63 %).

De las nueve especies de garrapatas identificadas durante los tres años, se observa una caída general del número de garrapatas extraídas del 2019 al 2020, con excepción de *D. reticulatus*, *H. lusitanicum* y *H. marginatum*, en las que aumentó (Figura 2). Tanto *D. reticulatus* como *H. marginatum* continuaron con esta tendencia ascendente en 2021, mientras que *H. lusitanicum* disminuyó. En 2021 *R. bursa* y el complejo *R. sanguineus* recuperaron su nivel de 2019. *H. punctata* aumentó ligeramente al nivel de 2019, mientras que *I. ricinus* y *D. marginatus* tuvieron un gran aumento respecto a los niveles detectados en 2019 y 2020.

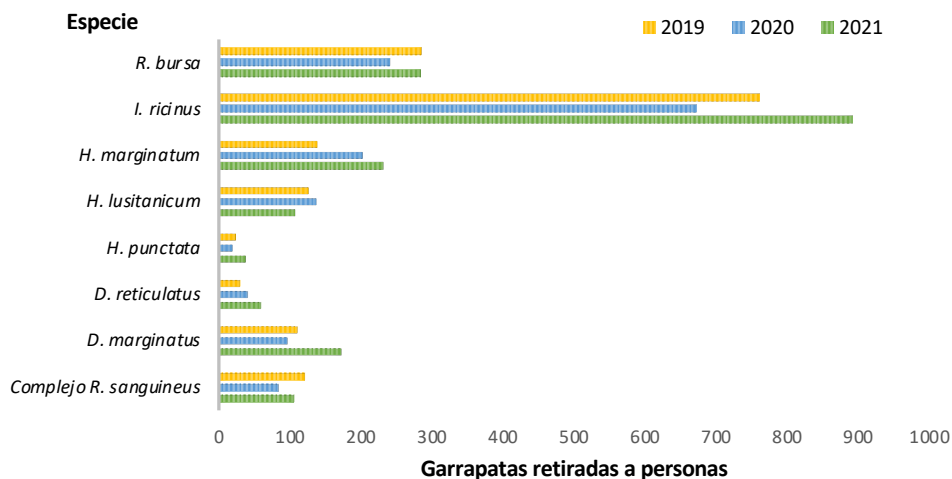


Figura 2. Distribución de especies de garrapatas retiradas a personas entre 2019 y 2021.

4.3. Grupos poblacionales

Las garrapatas retiradas a personas no sufrieron variaciones en 2019 y 2020. Sin embargo, en 2021 se produjo un gran aumento en el número de personas que acudían a los centros de salud y hospitales para la extracción de las garrapatas (Tabla 1).

La distribución por sexo se mantuvo en proporciones similares durante los tres años, siendo mucho más frecuente la picadura en hombres que en mujeres durante todo el estudio (64-65 % frente al 34-35 % respectivamente). Respecto a la edad, se aprecia que el único grupo en el que no aumentó el número de picaduras fue de 15 a 35 años, siendo este grupo el que menos reportó. El grupo de edad de más de 55 años fue en el que se realizaron más extracciones de garrapatas. La proporción entre garrapatas extraídas de hombres y mujeres se mantiene estable a lo largo de los tres años estudiados en cada grupo de edad.

Las partes del cuerpo más afectadas son la cabeza, el cuello y las extremidades inferiores durante los tres años de estudio.

TABLA 1. Distribución de extracciones de garrapatas según sexo y edad durante 2019, 2020 y 2021

Edad/sexo	Prepandemia (2019)		Pandemia (2020)		Postpandemia (2021)	
	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
0-14	187 (13,8%)	122 (9,1%)	173 (13,5%)	123 (9,6%)	233 (13,6%)	162 (9,5%)
15-35	150 (11,1%)	74 (5,5%)	151 (11,7%)	74 (5,8%)	171 (10,0%)	76 (4,4%)
36-55	235 (17,3%)	110 (8,2%)	216 (16,8%)	113 (8,8%)	303 (17,7%)	156 (9,1%)
Más de 55	317 (23,3%)	159 (11,7%)	293 (22,8%)	142 (11,0%)	389 (22,8%)	218 (12,8%)
Total	889 (65,5%)	465 (34,5%)	833 (64,8%)	452 (35,2%)	1096 (64,2%)	612 (35,8%)

5. DISCUSIÓN

La pandemia de SARS-CoV-2 generó una nueva realidad en el ecosistema de las garrapatas y en su relación con las personas (Cheval *et al.*, 2020). El número de picaduras reportadas siguió la media de 1200-1600 de años anteriores a 2020 (Estrada-Peña y De la Fuente, 2014), pero aumentó a cerca de 2000 garrapatas extraídas durante el año 2021. Esto podría deberse a que la pandemia dio lugar a un ambiente en el que se favoreció la proliferación de garrapatas de un año para otro o a una mayor actividad humana en zonas campestres en las que las picaduras son más frecuentes.

Durante los meses de confinamiento, el número de casos se redujo drásticamente, recuperando el patrón estacional cuando el aislamiento comenzó a suavizarse, similar a diferentes estudios de distribución de garrapatas en otros países europeos (Cull *et al.*, 2019; Lernout *et al.*, 2019).

De los 4347 reportes, el 64,8 % provenían de hombres y el 35,2 % de mujeres, siendo similares a los ya obtenidos en 2003 (Fernández, 2003) y entre 2014-2019 (Vieira *et al.*, 2022). Las picaduras en el grupo de edad +55 se redujeron en 2020, debido a la pandemia y a las posibles medidas de prevención adoptadas por este grupo de edad (Águila-Gordo *et al.*, 2021). No hay variación en cuanto a la extracción de garrapatas en las diferentes partes del cuerpo. Resultados similares a otros estudios realizados en Castilla y León y otras regiones de Europa (Cull *et al.*, 2019; Lernout *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2022).

Existe variación durante el periodo estudiado en la distribución de las garrapatas extraídas de personas según la provincia. Salamanca, Burgos, Ávila y León fueron las provincias con mayor número de extracciones. Esto difiere en parte de estudios anteriores en Castilla y León (Fernández, 2003), en las que no hubo tantas extracciones en la provincia de León. La variación podría deberse a la propia tendencia natural y no al efecto de la pandemia. Además, no hay diferencias entre las áreas rurales y urbanas, con la excepción de Valladolid, donde prácticamente se ha duplicado el porcentaje en áreas urbanas (36 % a 61,1 %).

Por último, se ha observado una disminución general del número de casos en 2020 respecto a 2019 en todas las especies identificadas con excepción de *D. reticulatus*, *H. lusitanicum* y *H. marginatum*, en las que ha aumentado. Esta observación pudiera estar directamente relacionada con los patrones estacionales propios de las garrapatas, observándose la disminución en aquellas especies más frecuentes en primavera que es la época donde tuvo lugar la mayor parte del confinamiento.

6. CONCLUSIONES

1. Hay evidencia de que la pandemia de SARS-CoV-2 ha alterado la distribución temporal y la cantidad de garrapatas extraídas en el año postpandemia.
2. La pandemia de SARS-CoV-2 alteró la distribución por especie de las garrapatas extraídas durante el año 2020.
3. Se produjo una alteración del número de personas de más de 55 años picados por garrapatas durante 2020, posiblemente debido a las medidas cautelares tomadas por este grupo de edad durante los meses de la pandemia de SARS-CoV-2.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Águila-Gordo D, Martínez-del Río J, Mazoterías-Muñoz V, Negreira-Caamaño M, Nieto-Sandoval Martín de la Sierra P, Piqueras-Flores J. Mortalidad y factores pronósticos asociados en pacientes ancianos y muy ancianos hospitalizados con infección respiratoria COVID. *Revista Española de Geriatría y Gerontología*. 2021; 56(5):259-267.
- Apanaskevich DA, Santos-Silva MM, Horak IG. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (acari: ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia Parasitol (Praha)*. 2008; 55(1):61-74.
- Cheval S, Mihai Adamescu C, Georgiadis T, Herrnegger M, Piticar A, Legates DR. Observed and Potential Impacts of the COVID-19 Pandemic on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17(11):4140.

- Cull B, Pietzsch ME, Gillingham EL, McGinley L, Medlock JM, Hansford KM. Seasonality and anatomical location of human tick bites in the United Kingdom. *Zoonoses Public Health*. 2019; 67, 112-121.
- Estrada-Peña A. Orden Ixodida: Las garrapatas. *Revista IDE@-SEA*. 2015; 13:1-15.
- Estrada-Peña A. Ticks as vectors: taxonomy, biology, and ecology. *Rev Sci Tech*. 2015 Apr; 34(1):53-65.
- Estrada-Peña A, De la Fuente J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res*. 2014; 108:104-128.
- Estrada-Peña A, Martínez JM, Sánchez Acedo C, Quílez J, Del Cacho E. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med Vet Entomol*. 2004; 18(4):387-397.
- Fernández Soto P. Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. Salamanca, Spain: Universidad de Salamanca; 2003.
- Gil-Collado J, Guillén JL, Zapatero LM. Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). *Rev. Ibérica. Parasitol*. 1979; 39:107-118.
- Lernout T, De Regge N, Tersago K, Fonville M, Suin V, Sprong H. Prevalence of pathogens in ticks collected from humans through citizen science in Belgium. *Parasit. Vectors* 2019; 12:550.
- Estrada-Peña A, Mihalca A, Petney T. Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification. 2017.
- Rochlin I, Toledo A. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini review. *J Med Microbiol*. 2020; 69(6):781-791.
- Vega de Cabo J, Fuente Díez E de la, Zimmermann Verdejo M. Modelos de estudios en investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño. *Medicina y Seguridad del Trabajo*. 2008; 54(210):81-88.
- Vieira Lista MC, Belhassen-García M, Vicente Santiago MB, Sánchez-Montejo J, Pedroza Pérez C, Monsalve Arteaga LC *et al*. Identification and distribution of human-biting ticks in northwestern Spain. *Insects*. 2022; 13(5):469.

El comité científico de *FarmaJournal* quiere agradecer la colaboración durante el proceso de revisión de los artículos de investigación publicados en este número a los siguientes profesores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca: María Ángeles Almeida Parra, María Encarnación Aparicio López, Antonio Blázquez Zaballos, Óscar Briz Sánchez, Manuel Fuentes García, Laura Gallego Yerga, José Ángel García Pedraza, Eliseo Herrero Hernández, Marta Lumbreras Martín, José Luis Pérez Pavón, Javier Robles Valero, Adela María Sánchez Ávila, Raquel Trujillano Hernández, María Belén Vicente Santiago, Hinojal Zazo Gómez.

NORMAS DE PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

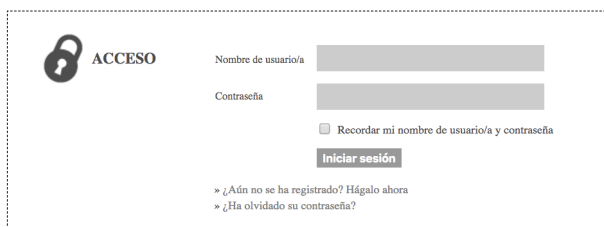
ENVÍOS EN LÍNEA A TRAVÉS DE «USAL REVISTAS

Previamente habrá que estar registrado en FarmaJournal; si es así le pedirá el nombre de usuario/a y contraseña.

[insertar enlace a <https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/login>]

En caso contrario tendrá que registrarse:

[insertar enlace a <https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/user/register>]



ACCESO

Nombre de usuario/a

Contraseña

Recordar mi nombre de usuario/a y contraseña

Iniciar sesión

» ¿Aún no se ha registrado? Hágalo ahora
» ¿Ha olvidado su contraseña?

LISTA PRELIMINAR PARA LA PREPARACIÓN DE ENVÍOS

Como parte del proceso de envíos, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

1. El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
2. El archivo de envío está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF o WordPerfect.
3. Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones URL para las referencias.
4. El texto tiene un interlineado sencillo, un tamaño fuente de 12 puntos, se utiliza cursiva en lugar de subrayado (excepto en las direcciones URL), y todas las ilustraciones, figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados, en vez de al final.
5. El texto reúne las condiciones estilísticas y bibliográficas incluidas en Pautas para el autor/a, en Acerca de la revista.
6. En el caso de enviar el texto a la sección de evaluación por pares, se siguen las instrucciones incluidas en asegurar una evaluación anónima.

DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y las direcciones de correo electrónico introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros o para su uso con otros fines.

ÍNDICE

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

- Alicia ABRIL; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Marta PRIETO; Ana I. MORALES, Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica 7-19
- Beatriz BAUTISTA SÁNCHEZ; Aránzazu ZARZUELO CASTAÑEDA, Diseño y desarrollo de una crema pañal con leche de burra..... 21-31
- Laura María MARTÍNEZ DE MORENTIN DE BENITO; Carlos TRECEÑO LOBATO; Elena VALLES MARTÍN, Valoración de la incidencia de prn/rnm en pacientes tratados con anticoagulantes orales y evaluación de la intervención farmacéutica en farmacia comunitaria 33-47
- Darío PERALLÓN MANTAS; Javier SÁNCHEZ MONTEJO; Antonio MURO ÁLVAREZ, Avances en el desarrollo de nuevas vacunas contra *Fasciola hepatica* 49-57
- Ángela PÉREZ SANCHO; Ramona MATEOS CAMPOS, Valoración de conocimientos, actitudes y comportamientos sobre las vacunas en la población 59-73
- Carlos RIVAS; Carmen VIEIRA; Antonio MURO, Distribución de picaduras de garrapatas retiradas a personas durante la pandemia del COVID-19 en Castilla y León 75-84

