farmajournal
volumen 9, número 2 (2024)
https://doi.org/10.14201/fj202492

**Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal.** Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús / **Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis.** Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Servicio de atención farmacéutica a personas mayores.** Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez / **Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos.** Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto / **Aplicación de la tecnología lamp (loop-mediated isothermal amplification) para el diagnóstico molecular de infecciones por schistosoma haematobium.** Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Metílico, 60 años envenenados.** Fernando Méndez / **Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal.** Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús / **Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis.** Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Servicio de atención farmacéutica a personas mayores.** Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez / **Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos.** Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto / **Aplicación de la tecnología lamp (loop-mediated isothermal amplification) para el diagnóstico molecular de infecciones por schistosoma haematobium.** Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Metílico, 60 años envenenados.** Fernando Méndez / **Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal.** Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús / **Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis.** Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Servicio de atención farmacéutica a personas mayores.** Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez / **Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos.** Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto / **Aplicación de la tecnología lamp (loop-mediated isothermal amplification) para el diagnóstico molecular de infecciones por schistosoma haematobium.** Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Metílico, 60 años envenenados.** Fernando Méndez / **Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal.** Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús / **Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis.** Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Servicio de atención farmacéutica a personas mayores.** Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez / **Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos.** Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto / **Aplicación de la tecnología lamp (loop-mediated isothermal amplification) para el diagnóstico molecular de infecciones por schistosoma haematobium.** Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Metílico, 60 años envenenados.** Fernando Méndez / **Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal.** Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús / **Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis.** Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto / **Servicio de atención farmacéutica a personas mayores.** Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez / **Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos.** Javier González; Javi

Ediciones Universidad Salamanca

farmajournal

e-ISSN: 2445-1355 — https://doi.org/10.14201/fj202492

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2024, vol. 9, n. 2

EDICIONES UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Dirección: Carmen GUTIÉRREZ MILLÁN, Universidad de Salamanca, Spain

Comité editorial: Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain
Carmen GUTIÉRREZ MILLÁN, Universidad de Salamanca, Spain
Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain
Marta PRIETO VICENTE, Universidad de Salamanca, Spain

Ayudante de dirección: Javier TASCÓN ROMERO, Universidad de Salamanca, Spain

Comité científico: Pilar AYUDA DURÁN, Oslo University Hospital-Radiumhospitalet, Norway
Clara Isabel COLINO GANDARILLAS, Universidad de Salamanca, Spain
Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ, Universidad de Salamanca, Spain
Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain
Antonio MURO ÁLVAREZ, 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:
Cristina Alcalde Eón, Jesús José Aldegunde Carrión, Adrián Bogeat Barroso, Beatriz Cartujo Redondo, Beatriz Castaño Rodríguez, Álvaro Gacho Temprano, Ana María González Paramás, Ángela Patricia Hernández García, Narciso Martín Quijada, Luz María Muñoz Centeno, Francisco Javier Pérez Bueno, Javier Sánchez Martín, Carmen Tejedor Gil, Lucía Velasco Roces y Victoria Joaquina Villasán García.

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: Gráficas LOPE – www.graficaslope.com

farmajournal

e-ISSN: 2445-1355 — https://doi.org/10.14201/fj202492

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2024, vol. 9, n. 2

# ÍNDICE

## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús, *Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal* ..... 7-17

Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto, *Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis* ..... 19-29

Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez *Servicio de atención farmacéutica a personas mayores* ..... 31-39

Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto, *Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos* ..... 41-50

Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto, *Aplicación de la tecnología lamp (*loop-mediated isothermal amplification*) para el diagnóstico molecular de infecciones por Schistosoma haematobium* ..... 51-61

## RESÚMENES DE CONFERENCIAS

Fernando Méndez, *Metílico, 60 años envenenados* ..... 65-66

farmajournal

e-ISSN: 2445-1355 — https://doi.org/10.14201/fj202492

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2024, vol. 9, n. 2

# INDEX

## RESEARCH REPORTS

Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús, *Ergosterol Liposomes in Lyophilized Formulations for Buccal Administration* ..... 7-17

Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto, *Application of LAMP Technology in the Molecular Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infections* ..... 19-29

Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez *Pharmaceutical Care Service for the Elderly* ..... 31-39

Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto, *Prediction of Immune Checkpoint Inhibitors-Associated Renal Damage in Oncology Patients* ..... 41-50

Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto, *Application of LAMP technology (Loop-mediated isothermal amplification) for molecular diagnosis of Schistosoma haematobium infections* ..... 51-61

## CONFERENCE ABSTRACTS

Fernando Méndez, *Methyl: 60 Years Poisoned* ..... 65-66

# Artículos de investigación

ISSN electrónico: 2445-1355
DOI: https://doi.org/10.14201/fj202492717

# LIPOSOMAS DE ERGOSTEROL EN FORMULACIONES LIOFILIZADAS DE ADMINISTRACIÓN BUCAL

## *Ergosterol Liposomes in Lyophilized Formulations for Buccal Administration*

Jimena BARBERO; Amparo SÁNCHEZ NAVARRO; María José DE JESÚS

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. C. Lic. Méndez Nieto, s/n. 37007 Salamanca

*Correo-e: mariajosedj@usal.es, asn@usal.es

RESUMEN: Los liposomas son vesículas lipídicas utilizadas como vehículos de fármacos que se estabilizan mediante liofilización. La vía bucal permite conseguir efectos sistémicos o locales. El ergosterol es el principal esterol de la membrana plasmática de los hongos y presenta diversas propiedades.

El objetivo de este trabajo es obtener formulaciones mucoadhesivas bucales a partir de liposomas de fosfatidilcolina y ergosterol preparados por sonicación y estabilizados por liofilización utilizando diferentes excipientes. Se prepararon liofilizados con dos geometrías y se caracterizaron las formulaciones obtenidas.

Se obtuvieron liposomas con un diámetro de entre 100 y 200 nm. La fosfatidilcolina se incorporó en un 97,56 ± 24,63% y la eficacia de encapsulación del ergosterol fue del 12,92 ± 2,24%. Todos los liofilizados presentaron una humedad residual inferior al 3,5%. Los liofilizados con alginato se desintegraron rápidamente en contacto con el fluido salival y los de goma xantana se hincharon progresivamente. No se detectó interacción entre la mucina y el alginato pero sí con la goma xantana.

Se concluye que los liofilizados con alginato son más adecuados para formulaciones bucodispersables y los de goma xantana, para formulaciones de liberación controlada.

*Palabras clave*: ergosterol; liposomas; liofilización; bucal; mucoadhesivo.

ABSTRACT: Liposomes are lipidic vesicles used as drug delivery systems which can be stabilized by lyophilization. Buccal mucosa allows local and systemic drug delivery. Ergosterol is the main sterol component in the fungal membrane and has multiple properties.

The aim of the present study was to obtain mucadhesive buccal formulations based on phosphatidylcholine and ergosterol liposomes prepared by sonication and stabilized by lyophilization. Different mixtures of liposomes and excipients in blisters with two geometries were lyophilized. The resulting lyophilizates formulations were characterized.

The obtained liposomes' size was between 100 and 200 nm. 97,56 ± 24,63% of the phosphatidylcholine was incorporated to the liposomes and the entrapment efficiency for ergosterol was 12,92 ± 2,24%. The residual moisture of the lyophilizates was less than 3,5%. Lyophilizates containing alginate rapidly disintegrated in contact with salivary fluid, while those with xantham gum swelled gradually. Interaction between mucin and alginate was not detected, but it was between xantham gum and mucin.

In conclusion, lyophilizates with alginate are more suitable for orodispersible formulations and those with xantham gum, for controlled release systems.

*Keywords*: ergosterol; liposomes; lyophilization: buccal; mucoadhesive.

## Introducción

### *Liposomas*

Los liposomas son vesículas esféricas de entre 20 nanómetros y 5 micras formadas al dispersar lípidos anfifílicos en agua (Liu P *et al.*, 2022).

Los liposomas se emplean como vehículos de fármacos hidrófilos o lipófilos (Franzé S e*t al.*, 2018), protegiéndolos del entorno. Su composición los hace seguros y biocompatibles, y pueden comportarse como sistemas de liberación controlada y vectorización (Liu P *et al.*, 2022).

Algunos inconvenientes de los liposomas son la degradación de los lípidos o fenómenos de agregación. El método de estabilización más estudiado es la liofilización (Franzé S e*t al.*, 2018).

*Liofilización*

La liofilización consiste en la congelación y posterior eliminación de agua por sublimación seguida de desorción en condiciones de vacío (Degobert G e*t al.*, 2021). Un liofilizado mantiene sus propiedades físico-químicas iniciales, y debe poseer una humedad residual baja, reconstituirse rápidamente y ser estable a largo plazo. Los liposomas liofilizados deben mantener su estructura y distribución de tamaños sin alterar la actividad del fármaco encapsulado (Degobert G e*t al.*, 2021).

*Administración de fármacos a través de mucosas*

Las mucosas son revestimientos de tejido húmedo formados por una capa de células epiteliales cubierta de moco y otra de tejido conectivo. El moco es un gel acuoso viscoelástico que incluye mucinas, unas glicoproteínas (Boddupalli BM e*t al.*, 2010).

La administración de fármacos a través de la mucosa bucal permite conseguir efectos sistémicos o locales, es cómoda y evita el efecto de primer paso hepático (Sahatsapan N *et al.*, 2022).

*Ergosterol*

El ergosterol (ERG) es el principal esterol de la membrana plasmática de los hongos; contribuye al mantenimiento de su integridad y tiene carácter anfipático (Rangsinth P *et al.*, 2023).

Por su baja solubilidad, se espera que la biodisponibilidad oral del ERG sea baja. Tras su administración oral en ratas, un 62,5% se elimina por heces y el resto se absorbe a nivel intestinal, metabolizándose a brasicasterol por la 7-dehidrocolesterol reductasa hepática (Kuwubara N *et al.*, 2022).

El ergosterol presenta numerosas propiedades farmacológicas (Rangsinth P *et al.*, 2023): es antioxidante, neuroprotector y antiinflamatorio, y tiene actividad antimicrobiana, anticancerígena y antidiabética. Expuesto a la luz ultravioleta, se transforma en ergocalciferol, un precursor de la vitamina D.

*Objetivos*

El objetivo de este trabajo es producir formulaciones mucoadhesivas bucales a partir de liposomas de ergosterol estabilizados por liofilización.

Se caracterizarán los liposomas, cuantificando la fosfatidilcolina y el ergosterol incorporados. Además, se evaluarán las propiedades de los liofilizados y se harán los ensayos propios de las formulaciones mucoadhesivas bucales.

## Materiales y métodos

*Materiales*

- **Reactivos**: acetonitrilo, ácido clorhídrico, agua ultrapura Mili-Q, alginato sódico (Alg), cloroformo, ergosterol (ERG), etanol puro, ferrotiocianato de amonio, fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC), goma xantana (GX), lactosa, manitol, mucina de estómago porcino, tampón fosfato (PBS) pH = 7, Tween 20.
- **Equipos**: agitador magnético RSLab 1M-Mini, agitador orbital termostatizado Labnet 222DS, agitador rotatorio Heidolph, balanza de precisión Mettler Toledo, baño de ultrasonidos ATU serie ATM, emblistadora Nicollembal, espectrofotómetro visible GENESYS™ 20 Thermo Scientific, estufa de secado Heraeus, filtros CHROMAFIL 0,45 µm, filtros de celulosa, HPLC Waters, micropipetas Eppendorf Reference® 2, microscopio óptico Swift 350T, liofilizador Telstar LyoBet, pH-metro serie s-619I Peak Instruments, vórtex Super Mixer Lab Line Instruments 1290.

*Métodos*

**Preparación de liposomas por sonicación**

Se pesaron la EPC y el ERG, mezclándolos en un vaso de precipitados y extendiéndolos por las paredes. A continuación, se incorporó progresivamente el medio líquido (PBS pH = 7) y se mezcló hasta formar una dispersión homogénea.

Se transfirió la dispersión a un balón de vidrio protegido de la luz que se colocó en el baño de ultrasonidos a 45 °C durante veinte minutos. Después, la mezcla se extruyó ocho veces utilizando filtros de 0,45 µm.

La mezcla extruida se almacenó en un envase topacio y se dejó una hora a temperatura ambiente. Los liposomas se conservaron en nevera al menos una hora antes de utilizarse.

La concentración de lípidos totales (% m/v) fue de 0,8, con una fracción molar de ERG ($X_{ERG}$) de 0,18 y de EPC ($X_{EPC}$), de 0,82.

### Caracterización de liposomas

- **Tamaño de los liposomas**: se estimó a partir de fotografías al microscopio con un objetivo X40.
- **pH de la dispersión liposomal**: se midió utilizando un pH-metro.
- **Cuantificación de la EPC en los liposomas**: se cuantificó por triplicado colorimétricamente en espectrofotómetro según el método descrito en la bibliografía (Charles J *et al*, 1980).
- **Cuantificación del ERG en los liposomas y cálculo de la eficacia de encapsulación (EE)**: se cuantificó por triplicado mediante HPLC con detección ultravioleta a λ = 282 nm. Se utilizó una columna C18 de 5 µm y una fase móvil de acetonitrilo 100% con un flujo de 1,5 mL/min.

Para la cuantificación del ERG en los liposomas, estos se rompieron agitando en vórtex 30 segundos las muestras diluidas 1:10 en etanol puro.

A partir de la cuantificación del ERG se calculó la eficacia de encapsulación (EE) según la fórmula:

$$EE\ (\%) = \frac{Concentración\ de\ ERG\ medida\ por\ HPLC\ (\mu g/mL)}{Concentración\ inicial\ de\ ERG\ (\mu g/mL)} \cdot 100$$

### Liofilización de los liposomas

Se utilizaron lactosa y manitol como lioprotectores y agentes de carga, y Alg o GX como gelificantes. Se añadieron, por orden, la lactosa, el manitol y el gelificante, agitando tras la adición de cada uno y manteniendo la mezcla final en nevera hasta su liofilización.

Se liofilizaron muestras de cuatro condiciones. Todas las condiciones incluían lactosa al 3% m/v y manitol al 2% m/v, y Alg o GX al 0,5% m/v o al 1% m/v.

Para su liofilización, cada muestra se acondicionó en blísters para comprimidos redondos y oblongos, pipeteando 0,7 mL de la mezcla de liposomas y excipientes en cada uno.

### Caracterización del liofilizado

- **Evaluación del aspecto**.
- **Humedad residual (HR) de los liofilizados**: se determinó gravimétricamente tras mantenerlos una hora en estufa a 120 °C por triplicado para cada condición. La HR se calculó con la fórmula:

$$HR = \frac{peso\ inicial\ del\ liofilizado - \ peso\ del\ liofilizado\ tras\ una\ hora\ en\ estufa}{peso\ inicial\ del\ liofilizado} \cdot 100$$

### Caracterización de las formulaciones bucales

- **Ensayo de hinchamiento**: se midió la evolución del peso de las formulaciones por triplicado para cada condición. Cada liofilizado se pesó y se le añadió 6 mL de un fluido salival sintético preparado según bibliografía (Ali J e*t al.,* 2021), manteniéndose a 35°C en un agitador orbital a 75 rpm. A los 2,5; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 90 y 120 minutos se retiró el fluido remanente y los liofilizados se pesaron. Tras pesarlos, se volvió a añadir el fluido retirado. Esto se repitió hasta la desintegración de los liofilizados en el fluido.
- **Ensayo de mucoadhesión**: se determinó espectrofotométricamente (λ = 500 nm) la mucina libre resultante de la interacción entre la mucina y los excipientes mucoadhesivos utilizados (Alg o GX) según bibliografía (Terlizzi V e*t al.*, 2022).

Se preparó fluido salival sintético con y sin mucina (FSM y FS, respectivamente) según el método descrito en la bibliografía (Ali J e*t al.,* 2021).

Se prepararon mezclas de FSM con Alg o GX al 0,1%, se incubaron dos horas a 37 °C en un agitador orbital a 40 rpm para simular las condiciones de la cavidad bucal, se filtraron con un filtro de 0,45 µm y se midió la absorbancia por triplicado para cuantificar la mucina libre.

### Análisis estadístico

Se realizó mediante un test ANOVA con el programa MINITAB. Para los perfiles de evolución del peso frente al tiempo del ensayo de hinchamiento se calculó el factor de similitud ($f_2$).

## Resultados y discusión

*Caracterización de los liposomas*

### Tamaño de los liposomas

Se estima que los liposomas preparados tienen un tamaño de entre 100 y 200 nm (Figura 1A). Tras la liofilización mantienen sus características y su tamaño aumenta ligeramente hasta los 150 – 300 nm (Figuras 1B, 1C y 1D).

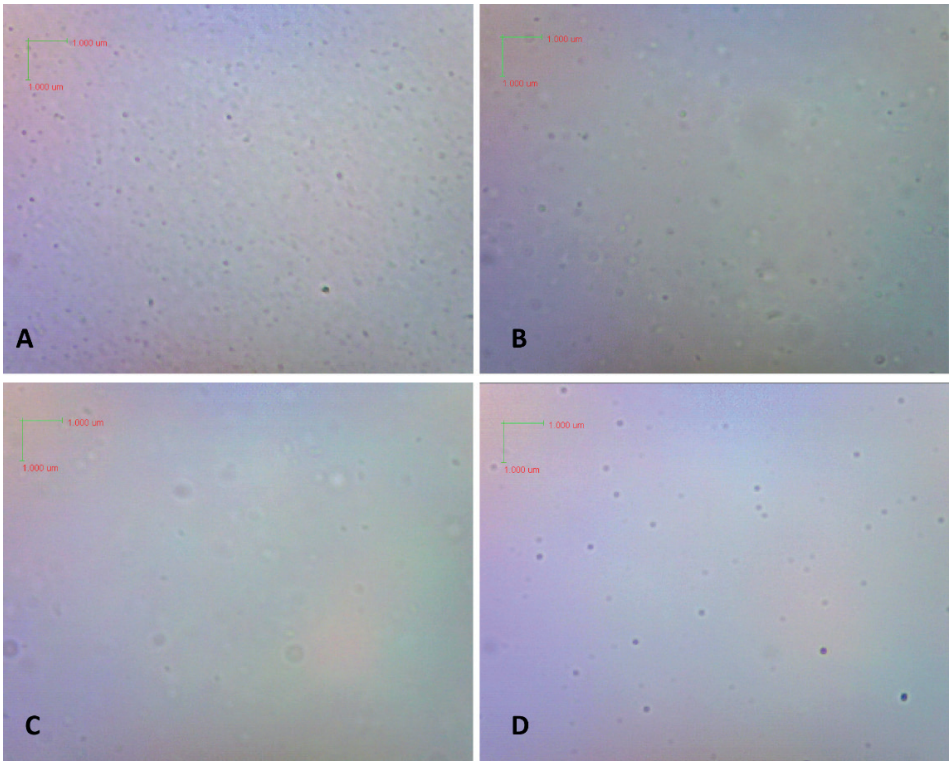



Figura 1: Imagen al microscopio de los liposomas (A: dispersión de liposomas; B: liposomas liofilizados reconstituidos en agua y filtrados con filtro de 0,45 µm; C: liposomas con Alg como gelificante reconstituidos en FS y filtrados con filtro de 0,45 µm; D: liposomas con GX como gelificante reconstituidos en FS y filtrados con filtro de 0,45 µm).

## pH de la dispersión de liposomas

El pH de la dispersión de liposomas fue de 7,0.

## Cuantificación de la EPC

A partir de la curva de calibrado realizada, se obtuvo un valor medio de EPC de 7,38 ± 1,86 mg/mL, con lo que se calcula que se incorpora a los liposomas el 97,56 ± 24,63% de la EPC utilizada.

## Cuantificación de ERG y cálculo de la EE

Mediante HPLC se cuantificó el ERG en los liposomas y se obtuvo un valor medio de 107,87 ± 17,60 µg/mL, con lo que se calcula una EE del 12,92 ± 2,24%.

*Caracterización del liofilizado*

### Aspecto

Todos los liofilizados presentan un aspecto esponjoso y un color blanquecino uniforme, sin diferencias apreciables entre Alg y GX (Figura 2).

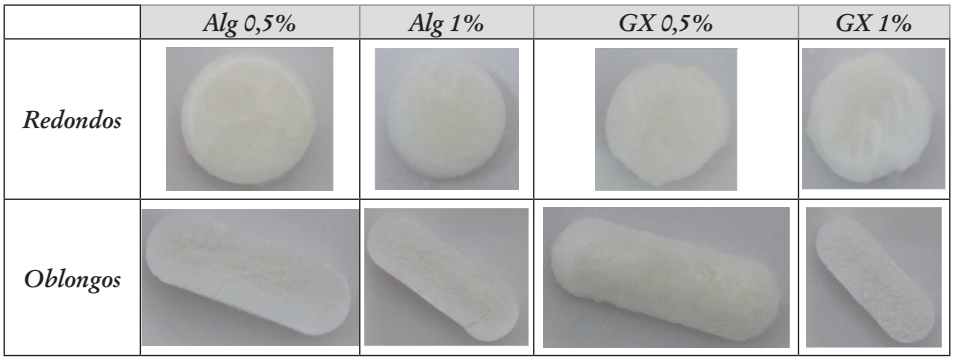



Figura 2: Liofilizados en blísteres redondos y oblongos.

## Humedad residual

En todas las condiciones se consigue una HR inferior al 3,5% (Figura 3).

Los liofilizados oblongos presentan una HR inferior a los redondos debido a que su mayor superficie (7 $cm^2$ frente a 4 $cm^2$) facilita la eliminación de agua durante la liofilización, aunque las diferencias no resultaron significativas ($p > 0,05$).

Las diferencias de HR según tipo y concentración de gelificante son significativas ($p < 0,05$): con ambos gelificantes la HR disminuye al aumentar la concentración, y los liofilizados con Alg presentan HR mayores. No se han encontrado datos sobre la influencia de los gelificantes en la HR de los liofilizados, pero las diferencias pueden deberse a que el Alg se une al agua a través de enlaces iónicos (Abka-khajouei e*t al.,* 2022), mientras que la GX establece puentes de hidrógeno (Nsengiyumva EM e*t al.,* 2022).

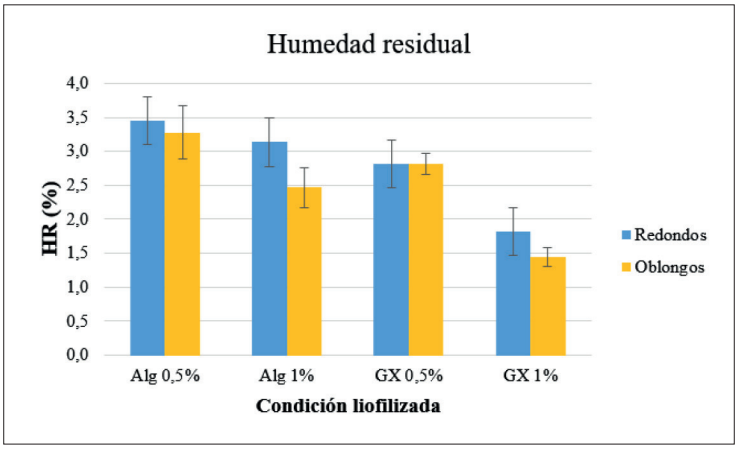



Figura 3: HR de las condiciones evaluadas.

*Caracterización de las formulaciones bucales*

**Ensayo de hinchamiento**

Los liofilizados con Alg, independientemente de su concentración, se desintegran en menos de 3 minutos al entrar en contacto con el FS, considerándose formulaciones bucodispersables (Real Farmacopea Española, 2015). Por el contrario, los de GX se hinchan progresivamente y tardan más en disgregarse.

Los liofilizados oblongos presentan mayores aumentos de peso que los redondos, aunque las diferencias no son significativas ($p > 0,05$), debido a que la mayor superficie de los liofilizados oblongos facilita la captación de agua por el liofilizado.

Los liofilizados con un 1% de GX presentan aumentos de peso inferiores a los liofilizados con un 0,5% de GX, aunque las diferencias no son significativas ($p > 0,05$).

La comparación del perfil de evolución del peso de los liofilizados con GX frente al tiempo a través del cálculo de $f_2$ indica que en todos los casos los perfiles son muy similares.

**Ensayo de mucoadhesión**

En las condiciones estudiadas no se detecta interacción entre la mucina y el Alg pero sí con la GX. La concentración de mucina libre tras el contacto con el Alg es de 10,65 ± 0,14 mg/mL y, para la GX, de 8,43 ± 1,92 mg/mL. Se determina

que el porcentaje de mucina unida a la GX es del 15,67 ± 3,57 %, mientras que para el Alg no se aprecia unión.

La GX interacciona con la mucina formando puentes de hidrógeno, uniones polares y fuerzas de Van der Waals (Ahmad M e*t al.*, 2021); el Alg, a través de puentes de hidrógeno mayoritariamente (Agüero L e*t al.,* 2017). A pH 7, la mucina y los dos gelificantes tienen carga negativa (Ahmad M e*t al.*, 2021; Agüero L e*t al.,* 2017), lo que genera fuerzas electrostáticas de repulsión capaces de contrarrestar el establecimiento de puentes de hidrógeno entre la mucina y Alg (Agüero L e*t al.,* 2017).

## Conclusiones

Se han obtenido liposomas cargados con ergosterol mediante un procedimiento exento de disolventes orgánicos, optimizando un proceso de liofilización para incluirlos en formulaciones bucales.

El proceso de liofilización aplicado consigue la estabilización de los liposomas que, en el fluido salival, se rehidratan y son liberados al medio.

Los liofilizados con alginato se desmoronan rápidamente en presencia de fluido salival y no interaccionan con la mucina, características más favorables para formulaciones bucodispersables.

Los liofilizados con goma xantana se hinchan progresivamente, manteniendo su integridad en presencia de fluido salival más tiempo e interaccionan con la mucina, características favorables para formulaciones de liberación controlada.

No hay diferencias relevantes entre liofilizados redondos y oblongos, aunque los oblongos presentaron mejores resultados en los ensayos de hinchamiento y humedad residual. Habría que valorar su aceptación y viabilidad para su administración bucal.

## Bibliografía

Abka-khajouei R, Tounsi L, Shahabi N, Patel AK, Abdelkafi S, Michaud P. Structures, Properties and Applications of Alginates. Mar Drugs. 2022; 20(6):364.

Agüero L, Zaldivar-Silva D, Peña L, Dias M. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. Carbohydr Polym. 2017; 168:32-43.

Ahmad M, Ritzoulis C, Chen J, Meigui H, Bushra R, Jin Y, et al. Xanthan gum – mucin complexation: Molecular interactions, thermodynamics, and rheological analysis. Food Hydrocoll. 2021; 114:106579.

Ali J, Bong Lee J, Gittings S, Iachelini A, Bennett J, Cram A, et al. Development and optimisation of simulated salivary fluid for biorelevant oral cavity dissolution. Eur J Pharm Biopharm. 2021; 160:125-33.

Boddupalli BM, Mohammed ZNK, Nath A. R, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. J Adv Pharm Technol Res. 2010; 1(4):381-7.

Charles J, Stewart M. Colorirnetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. Anal Biochem. 1980; 104(1):10-14.

Degobert G, Aydin D, Mosqueira F, Araújo RS. Lyophilization of Nanocapsules: Instability Sources, Formulation and Process Parameters.Pharmaceutics. 2021; 13(8):1112.

Franzé S, Selmin F, Samaritani E, Minghetti P, Cilurzo F. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. Pharmaceutics. 2018; 10(3):139.

Kuwabara N, Ohta-Shimizu M, Fuwa F, Tomitsuka E, Sato S, Nakagawa S. Ergosterol increases 7-dehydrocholesterol, a cholesterol precursor, and decreases cholesterol in human HepG2 cells. Lipids. 2022; 57(6):303-11.

Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. Molecules. 2022; 27(4):1372.

Nsengiyumva EM, Alexandridis P. Xanthan gum in aqueous solutions: Fundamentals and applications. Int J Biol Macromol. 2022; 216:583-604.

Rangsinth P, Sharika R, Pattarachotanant N, Duangjan C, Wongwan C, Sillapachaiyaporn C, et al. Potential Beneficial Effects and Pharmacological Properties of Ergosterol, a Common Bioactive Compound in Edible Mushrooms. Foods. 2023; 12(13):2529.

Real Farmacopea Española. AEMPS; 2015.

Sahatsapan N, Pamornpathomkul B, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Poonkhum R, Opanasopit P, et al. Feasibility of mucoadhesive chitosan maleimide-coated liposomes for improved buccal delivery of a protein drug. J Drug Deliv Sci Technol. 2022; 69:103173.

Terlizzi V, Scudieri P, Bertozzi F, Guerini M, Condrò G, Perugini P. Evaluation of the Mucoadhesive Properties of Chitosan-Based Microstructured Lipid Carrier (CH-MLC). Pharmaceutics. 2022; 14(1):170.

ISSN electrónico: 2445-1355
DOI: https://doi.org/10.14201/fj2024921929

# APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA LAMP EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIONES POR *Strongyloides stercoralis*

## *Application of LAMP Technology in the Molecular Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infections*

Julia FERNÁNDEZ CENCERRADO; Beatriz CREGO-VICENTE; Manuel DIEGO DEL OLMO; Pedro FERNÁNDEZ-SOTO

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Grupo e-INTRO (Enfermedades Infecciosas y Tropicales). IBSAL-CIETUS. Área de Parasitología, Facultad de Farmacia, Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca, España

*Correo-e: pfsoto@usal.es

RESUMEN: La estrongiloidosis (infección por *Strongyloides stercoralis*) es una enfermedad tropical desantendida de elevada prevalencia mundial, principalmente en climas tropicales y subtropicales. Cursa desde casos asintomáticos hasta crónicos, con relevancia en individuos inmunocomprometidos. En casos graves puede producirse un sindrome de hiperinfección y diseminación larvaria a varios órganos con elevada mortalidad. Su diagnóstico carece de una prueba de referencia estándar que dificulta la estimación de la precisión de otras pruebas diagnósticas. En estudios previos, desarrollamos un método molecular basado en la tecnología LAMP para la detección de ADN de *Strongyloides* spp. (*Strong*-LAMP) con alta especificidad y sensibilidad. Aquí, evaluamos su funcionamiento en muestras de heces de pacientes recogidas y almacenadas en papel de filtro como método simple de conservación y transporte de muestras clínicas desde zona endémica de estrongiloidosis al laboratorio. Se seleccionaron 20 muestras conservadas en papel de filtro de un total de 192 recogidas y analizadas por microscopía y *Strong*-LAMP en un estudio realizado en Cubal, Angola. Se extrajo el ADN y se analizaron en el laboratorio. Los

resultados indican que el papel de filtro es un soporte potencialmente válido para el transporte y conservación de muestras de heces para el diagnóstico molecular mediante *Strong*-LAMP de la estrongiloidosis.

*Palabras clave*: LAMP; *Strongyloides stercoralis*; *Strong*-LAMP; diagnóstico molecular; Cubal; Angola.

ABSTRACT**:** Strongyloidiasis (*Strongyloides stercoralis* infection) is a neglected tropical disease of high prevalence worldwide, mainly in tropical and subtropical climates. It ranges from asymptomatic to chronic cases, with relevance in immunocompromised individuals. In severe cases, hyperinfection syndrome and larval dissemination to various organs can occur with high mortality. Diagnosis lacks a standard reference test, which makes it difficult to estimate the accuracy of other diagnostic tests. In previous studies, we developed a molecular method based on LAMP technology for the detection of *Strongyloides* spp. DNA (*Strong*-LAMP) with high specificity and sensitivity. Here, we evaluate its performance on patient stool samples collected and stored on filter paper as a simple method of preservation and transport of clinical samples from a *Strongyloides* endemic area to the laboratory. Twenty samples preserved in filter paper were selected from a total of 192 samples collected and analysed by microscopy and *Strong*-LAMP in a study conducted in Cubal, Angola. DNA was extracted and analysed in the laboratory. The results indicate that filter paper is a potentially valid carrier for transport and preservation of stool samples for *Strong*-LAMP molecular diagnosis of strongyloidosis.

*Keywords*: LAMP; *Strongyloides stercoralis*; *Strong*-LAMP; molecular diagnostic; Cubal; Angola.

## 1. Introducción

La estrongiloidosis es una enfermedad causada principalmente por el nematodo parásito *Strongyloides stercolaris,* endémica de climas tropical y subtropical, aunque también presente en zonas templadas. *S. stercoralis* es un parásito que se transmite por el suelo (geohelminto). Su ciclo biológico es único, con dos formas de transmisión: heteroinfección (por penetración transcutánea de larvas filariformes) y autoinfección (transformación en el intestino grueso de larvas rabditiformes en filariformes); ésta es una característica biológica exclusiva del género *Strongyloides* spp. (Page *et al*, 2018).

Se estima una prevalencia global de 600 millones de personas infectadas con *S. stercoralis*, con un 76% de la carga mundial en África subsahariana, sudeste asiático, Latinoamérica y regiones del Pacífico Oeste (Buonfrate *et al*, 2020). La estrongiloidosis está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 20 entidades tropicales olvidadas o desatendidas (*Neglected Tropical Diseases*; NTDs) (WHO, 2023).

La clínica de la estrongiloidosis depende de la etapa de invasión y desarrollo del parásito, de la capacidad de autoinfección y del estado inmunológico del paciente. Puede aparecer como: *i)* estrongiloidosis aguda: generalmente en viajeros que regresan de zona endémica, con dermatitis pruriginosa (penetración transcutánea de larvas), neumonitis con tos (paso de larvas por los pulmones) y fiebre. Cuando los parásitos alcanzan el intestino aparece dolor gastrointestinal con diarrea, náuseas y vómitos; *ii)* estrongiloidiasis crónica: habitualmente asintomática, aunque pueden aparecer manifestaciones gastrointestinales, pulmonares, cutáneas y eosinofilia; y *iii)* en individuos inmunosuprimidos (p.ej. tratamientos inmunosupresores por anti-TNF, corticosteroides, trasplante de órganos sólidos o hematopoyéticos, cáncer, infección por HTLV-1) puede aparecer el síndrome de hiperinfección por la migración larvaria, con manifestaciones intestinales y pulmonares graves, fiebre, y aparecerá un número elevado de larvas en las heces y en esputo (Schär *et al*, 2013). Las larvas pueden atravesar la barrera hematoencefálica, produciendo encefalitis con elevadas tasas de mortalidad (hasta el 87%). En esta situación, el tratamiento ya no es efectivo por lo que un cribado de sospecha de posible estrongiloidosis antes de los tratamientos inmunosupresores es de vital importancia.

La ivermectina es el tratamiento de elección de la estrongiloidosis (200 µg/kg/día; 2 días); el alternativo, es el albendazol (400 mg/12h; 2días; puede prolongarse la terapia hasta 7 días) (Henríquez-Camacho *et al*, 2016).

La estrongiloidosis es una de las enfermedades parasitarias más díficiles de diagnosticar debido a la concurrencia de tres factores principales: *i)* la presencia de casos subclínicos o levemente sintomáticos; *ii)* la carga parasitaria generalmente muy baja con una expulsión irregular de larvas y, *iii)* la falta de una prueba diagnóstica *"gold standard"*. El método diagnóstico de referencia es la observación microscópica de larvas rabditiformes en heces, pero tiene escasa sensibilidad (≤30%). Los métodos serológicos, aunque sensibles, tienen muy poca especificidad y la detección de anticuerpos persiste mucho tiempo tras el tratamiento. Los métodos moleculares (mayoritariamente, basados en la PCR; *polymerase chain reaction*) son sensibles y específicos, pero no están estandarizados, presentan discrepancias en su precisión, son caros y técnicamente complejos de realizar e implementar en zona endémica (Buonfrate *et al*, 2018). Una alternativa molecular de bajo coste, rapidez, simplicidad de realización e interpretación, con elevada sensibilidad y especificidad es la tecnología de amplificación isotérmica de ácidos

nucleicos mediada por bucles tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (Notomi *et al*, 2000).

La tecnología LAMP se basa en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, mediante una *Bst* polimerasa *(de Bacillus stearothermophylus)* en condiciones isotérmicas (60-65 ºC) y un sistema de 4/6 cebadores o *primers:* dos internos, *Forward Inner Primer* (FIP) y *Backward Inner Primer* (BIP); dos externos (F3 y B3), y, opcionalmente, 2 cebadores bucle o *loop primers* (FLP y FLB), que permiten acelerar la reacción por unión a sitios no accesibles a los cebadores internos. Se reconocen así 6/8 regiones distintas en el ADN diana, confiriendo una elevada especificidad en la detección. Se puede realizar el LAMP en un simple termobloque y visualizar los resultados por un cambio de color al añadir un reactivo intercalante en el ADN (Soroka *et al*, 2021). Hasta la fecha, solo hay desarrollados dos ensayos LAMP para la detección de ADN de *S. stercoralis*: uno, basado en el gen *28S RNAr* (Watts *et al*, 2014); otro, basado en una secuencia parcial de 329 pares de bases (pb) del gen *18S RNAr* de *Strongyloides* spp., desarrollado en el CIETUS (Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca) y denominado *Strong*-LAMP (Fernández-Soto *et al*, 2016). El *Strong*-LAMP ha demostrado en estudios anteriores su efectividad en la detección de ADN de *S. stercoralis* en muestras de heces y orina en modelo experimental de infección en el laboratorio y en muestras de heces y orina de pacientes con estrongiloidosis confirmada por microscopía, qPCR y/o sospecha serológica. Recientemente, se ha comprobado su mayor eficacia frente a la microscopía en un estudio en zona endémica de estrongiloidosis en Cubal, Angola (Crego-Vicente *et al*, 2023).

## 2. Hipótesis y Objetivos

El método *Strong*-LAMP desarrollado en el CIETUS para la detección molecular de *S. stercoralis* ha resultado eficaz en el diagnóstico de la estrongiloidosis en muestras frescas de heces de pacientes en condiciones de campo en zona endémica (Cubal, Angola). Sería de interés evaluar su funcionamiento en muestras recogidas y almacenadas en papel de filtro como método simple de conservación y transporte de muestras clínicas desde zona endémica al laboratorio.

Objetivo general. Aplicar y valorar el método *Strong*-LAMP para la detección de ADN de *S. stercoralis* en muestras de heces de individuos residentes en zona endémica de estrongiloidosis (Cubal, Angola) almacenadas en papel de filtro.

Objetivos específicos.

1. Obtener ADN a partir de muestras de heces almacenadas en papel de filtro de individuos residentes en zona endémica.
2. Aplicar y evaluar la técnica *Strong*-LAMP para la detección de *S. stercoralis.*

3. Comparar su eficacia con los resultados de LAMP obtenidos en condiciones de campo en zona endémica.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. *Muestras y zona de estudio*

Se recolectaron 192 muestras de heces de población atendida en el Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal (Angola) como parte de un estudio realizado por el CIETUS y el Hospital Vall d'Hebron durante junio-agosto de 2022 para conocer la prevalencia de *S. stercoralis*. Se analizaron parasitológicamente mediante DSM (*Direct Saline Microscopy*) y Baermann para buscar la presencia de larvas y molecularmente mediante *Strong*-LAMP. Una porción de cada muestra de heces se extendió en un papel de filtro, se secó al aire, se envolvió individualmente en un papel de aluminio, se etiquetó y se envió posteriormente al CIETUS (Salamanca, España) para su almacenaje en refrigeración a 4ºC.

### 3.2. *Selección de muestras*

Se seleccionaron en el CIETUS 20 muestras/192 analizadas en Cubal, incluyendo: 5 parasitológicamente y *Strong*-LAMP positivas; 10 parasitológicamente negativas y *Strong*-LAMP positivas; y 5 parasitológicamente y *Strong*-LAMP negativas.

### 3.3. *Obtención de ADN*

#### 3.3.1. Obtención de ADN de *Strongyloides venezuelensis*

Como control positivo de amplificación en las reacciones de *Strong*-LAMP se utilizó ADN de larvas L3 infectivas (iL3) de *S. venezuelensis (Sv)*, cuyo ciclo biológico se mantiene en ratas Wistar infectadas experimentalmente en el CIETUS. Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (Nzytech, Lisbon, Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN obtenido se midió en un espectrofotómetro NanoDrop y se ajustó a una concentración final de 1 ng/µL. El ADN se almacenó a -20ºC hasta su uso. Se utilizaron 2 µL de ADN de *Sv* como control positivo en cada reacción de *Strong*-LAMP.

#### 3.3.2 Obtención de ADN de heces conservadas en papel de filtro

Se realizó siguiendo la metodología descrita previamente en Cevallos *et al* (2018) y mediante el kit comercial *NZY Soil gDNA Isolation kit* (Nzytech, Lisbon,

Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 1). Se utilizaron 2 µL de ADN de cada muestra como molde en las reacciones de *Strong*-LAMP.

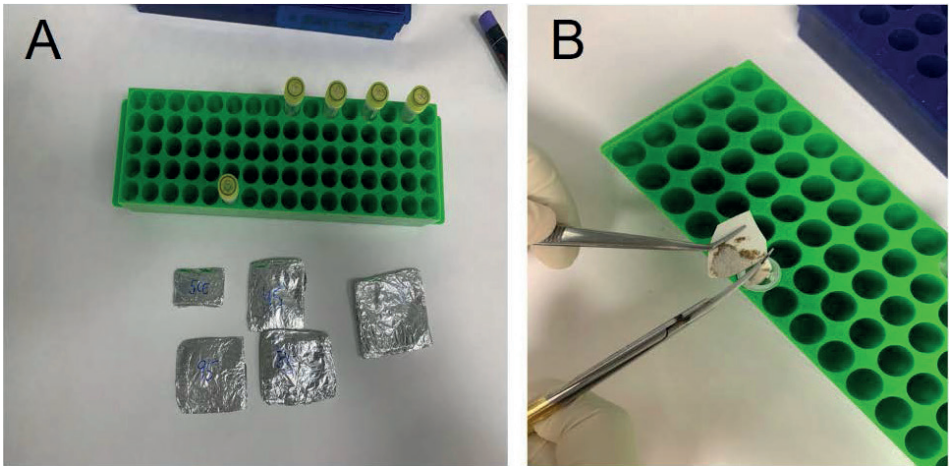



Figura 1. Obtención de ADN a partir de muestras de heces de pacientes almacenadas en papel de filtro. A) Las muestras de heces se mantienen en papel de filtro envueltas en papel de aluminio. B) Cada papel de filtro conteniendo la muestra es cortado en pequeños trozos para su incorporación en el buffer de extracción del kit para su digestión inicial. Posteriormente se siguen los pasos del kit según el fabricante.

### 3.4. *Análisis molecular de muestras heces*

Las 20 muestras seleccionadas se analizaron mediante el método *Strong*-LAMP realizado de forma colorimétrica utilizando las mismas mezclas y metodología descritas en Fernández-Soto *et al* (2016). Las mezclas se incubaron en un termobloque durante 50 min a 65ºC, más 10 min a 80ºC para desactivar la enzima y parar la reacción. Las reacciones se realizaron en lotes de 5 muestras para favorecer el manejo, evitar contaminaciones e incorporando un control negativo (agua en lugar de ADN) y un control positivo (ADN de iL3 de *Sv*).

### 3.5. *Detección de los productos de amplificación*

El revelado de los resultados del *Strong*-LAMP colorimétrico se realizó postamplificación, añadiendo a los tubos 2 µL/tubo del colorante intercalante SYBR® Green I (1:10; 10,000X; Invitrogen). Las muestras negativas (sin ADN amplificado) mantienen el color naranja original del colorante; las muestras positivas (con ADN amplificado) viran a color verde por incorporación del colorante.

## 4. Resultados

Los resultados de los distintos lotes de las muestras de heces analizadas mediante *Strong*-LAMP se muestran en la Fig. 2 y Tabla 1. De las 5 muestras parasitológicamente y *Strong*-LAMP positivas, solamente se obtuvo un resultado positivo (nº. 70) (Fig. 4A); de las 10 muestras parasitológicamente negativas y *Strong*- LAMP positivas, se obtuvieron 5 resultados positivos (nº. 82, 95 y 5C, 25 y 49) (Fig. 4B y 4C); en el lote de 5 muestras parasitológicamente y *Strong*-LAMP negativas, todas resultaron negativas (Fig.4D).

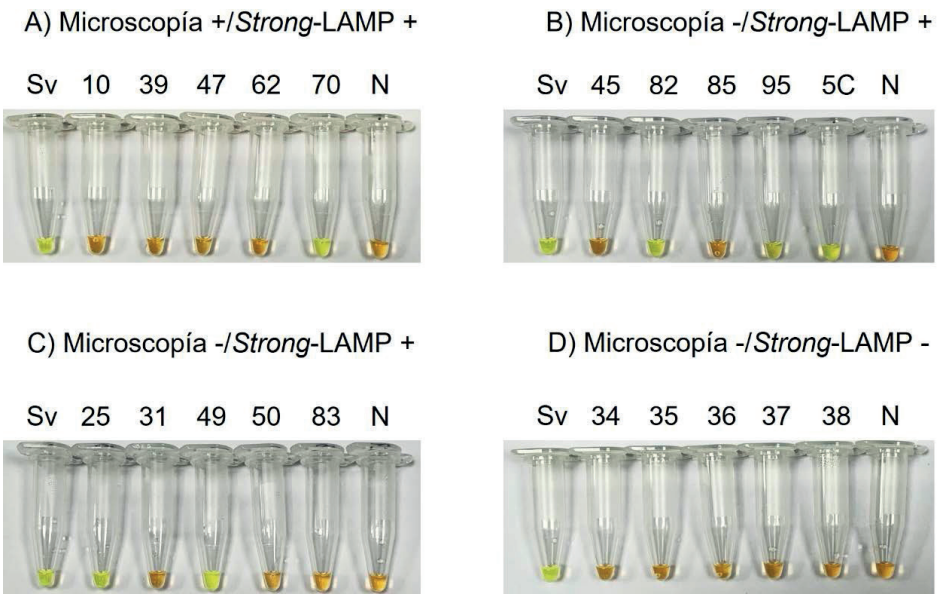



Figura 2. *Strong*-LAMP colorimétrico de las muestras de heces almacenadas en papel de filtro recogidas en Cubal, Angola. A) Muestras (5) con resultado parasitológicamente positivo y *Strong*-LAMP positivo. B) y C) Muestras (10) con resultado parasitológicamente negativo y *Strong*-LAMP positivo. D) Muestras (5) con resultado parasitológicamente negativo y *Strong*-LAMP negativo. Sv, controles positivos (ADN de *S. venezuelensis*); N, controles negativos (agua sustituyendo al ADN); los números indican las muestras analizadas. El color verde indica resultado positivo y el color naranja resultado negativo.

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos (+/-) en muestras de heces de pacientes mediante microscopía (DSM + Baerman) y *Strong*-LAMP realizados en Cubal (Angola) y el *Strong*- LAMP realizado en muestras almacenadas en papel de filtro en el laboratorio del CIETUS (Salamanca, España).

| Muestra Nº | Microscopía Cubal | *Strong*-lamp Cubal | *Strong*-lamp cietus |
|---|---|---|---|
| 10 | + | + | - |
| 39 | + | + | - |
| 47 | + | + | - |
| 62 | + | + | - |
| 70 | + | + | + |
| 45 | - | + | - |
| 82 | - | + | + |
| 85 | - | + | - |
| 95 | - | + | + |
| 5C | - | + | + |
| 25 | - | + | + |
| 31 | - | + | - |
| 49 | - | + | + |
| 50 | - | + | - |
| 83 | - | + | - |
| 34 | - | - | - |
| 35 | - | - | - |
| 36 | - | - | - |
| 37 | - | - | - |
| 38 | - | - | - |

## 5. Discusión

El diagnóstico de la estrongiloidosis es muy complicado. El análisis coproparasitológico continúa siendo el *gold standard*, pero escasamente sensible. La serología presenta reactividad cruzada con otras helmintosis y baja sensibilidad en países endémicos. Los métodos moleculares (PCR y variantes) son sensibles y específicos, pero técnicamente complejos, caros, requieren equipos y personal especializados no están estandarizados y presentan discrepancias entre estudios, tanto en laboratorio como en zonas endémicas (Buonfrate *et al*, 2018). La tecnología

LAMP reúne las características necesarias de un ensayo de diagnóstico molecular de elevada eficacia con un sencillo funcionamiento para su potencial uso en el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas, incluidas las parasitarias, en condiciones de campo en zona endémica (Li et al, 2017; García-Bernalt Diego *et al*, 2021). El *Strong*-LAMP diseñado en el CIETUS (Fernández-Soto *et al*, 2016) se ha utilizado por primera vez en el diagnóstico de campo en zona endémica de estrongiloidosis en Cubal (Angola) con resultados superiores a la microscopía (35.9% *vs.* 9.4%, respectivamente) (Crego-Vicente *et al*, 2023).

No obstante, la obtención y análisis de ADN en condiciones de campo presenta habitualmente problemas por falta de infraestructura adecuada y garantías de mantenimiento de la cadena de frío para su conservación y transporte. Se ha comprobado una disminución del rendimiento diagnóstico del *Strong*-LAMP entre condiciones de campo (con ADN recién extraído) y posteriormente en un laboratorio bien equipado (con ADN parcialmente degradado tras un inadecuado almacenaje y transporte) (Crego-Vicente *et al*, 2023). Una pequeña porción de las 192 muestras de heces analizadas en Cubal se depositó en papel de filtro para comprobar si este soporte resultaría efectivo en la conservación y transporte simple de las muestras y posterior extracción de ADN en el laboratorio. Este procedimiento ya resultó eficaz para detectar ADN de *Amphimerus* sp. en heces humanas procedentes de Ecuador (Cevallos *et al*, 2018).

En este trabajo, cabría esperar un resultado colorimétrico positivo *Strong*-LAMP en las 15 muestras que resultaron positivas por el mismo método en zona endémica (lotes A, B y C). Sin embargo, sólo obtuvimos un resultado *Strong*-LAMP positivo en 6/15 (40%) (nos. 70, 82, 95, 5C, 25 y 49). El análisis del papel de filtro de las muestras negativas (tanto por microscopía y *Strong*-LAMP en zona endémica) resultó negativo, confirmando la ausencia de falsos positivos y correcta realización de la técnica. Los resultados negativos en 10 muestras podrían explicarse por: *i)* la pequeña cantidad de materia fecal conservada en el papel de filtro para obtener ADN; *ii)* la toma de muestras sin concentrar previamente, que hubiera aumentado la posible presencia de larvas (siempre escasísima en infecciones crónicas de zona endémica); y *iii)* posibles inhibidores que dificultarían la extracción de ADN (nucleasas, proteasas bacterianas, ácidos biliares, etc.) (Crego-Vicente *et al*, 2023). La eficacia del papel de filtro como soporte para la recogida, transporte y conservación de muestras de heces para la extracción y detección de ADN de larvas de *Strongyloides* spp. podría posiblemente aumentarse en futuros trabajos optimizando los inconvenientes señalados.

## 6. Conclusiones

Primera. Se ha conseguido extraer ADN de muestras de heces humanas conservadas en papel de filtro de individuos de zona endémica para la detección molecular de *Strongyloides* spp. mediante el método molecular colorimétrico *Strong*-LAMP.

Segunda. El papel de filtro es un soporte potencialmente válido para el transporte y conservación de muestras de heces para el diagnóstico molecular de la estrongiloidosis.

## 7. Bibliografía

Buonfrate D, Bisanzio D, Giorli G, Odermatt P, Furst T, Greenaway C, et al. The global prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection. Pathogens. 2020;9:468.

Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Clin Microbiol Infect. 2015; 21(6):543-552.

Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—a systematic review and meta-analysis. PloS Negl Trop Dis. 2018;12:e0006229.

Cevallos W, Fernández-Soto P, Calvopiña M, Buendía-Sánchez M, López-Abán J, Vicente B. *et al.* Diagnosis of amphimeriasis by LAMPhimerus assay in human stool samples long-term storage onto filter paper. PLoS One. 2018; 13(2):e0192637.

Crego-Vicente B, Febrer-Sendra B, Nindia A, Pessela A, Aixut S, Martínez-Campreciós J, Mediavilla A, Silgado A, Sulleiro E, Treviño B, Molina I, Muro A, Salvador F, Fernández-Soto P. First field study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2023; 31;16(1):393.

Fernández-Soto P, Sánchez-Hernández A, Gandasegui J, Bajo Santos C, López-Abán J, Saugar JM, et al. Strong-LAMP: a LAMP assay for *Strongyloides* spp. Detection in stool and urine samples towards the diagnosis of human strongyloidiasis starting from a rodent model. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004836.

García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Muro A. LAMP in Neglected Tropical Diseases: A Focus on Parasites. *Diagnostics*. 2021; 11(3):521.

Henríquez-Camacho C, Gotuzzo E, Echevarría J, White AC Jr, Terashima A, Samalvides F *et al.* Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strogyloides stercoralis* infection. Cochrane Database Syst Rev. 2016; (1):CD007745.

Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. Microb Pathog. 2017; 107:54-61.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28(12):E63.

Page W, Judd J, Bradbury R. The unique life cycle of *Strongyloides stercoralis* and implications for public health action. Trop Med Infect Dis. 2018;3:53.

Schär F, Trostdort U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Vounatsou P *et al. Strongyloides stercoralis:* Global Distribution and Risk Factors. Plos Neglect Trop D. 2013; 7(7):e2288.

Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? Cells. 2021;10:1931.

Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. Am J Trop Med Hyg. 2014;90:306-11.

World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections (acceso el 22 de enero de 2023).

ISSN electrónico: 2445-1355
DOI: https://doi.org/10.14201/fj2024923139

# SERVICIO DE ATENCIÓN FARMACÉUTICA A PERSONAS MAYORES

## *Pharmaceutical Care Service for the Elderly*

Natalia GARCÍA PLATA; Paulo TEIXEIRA DA SILVA; Ana MARTÍN SUAREZ

Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

*Correo-e: amasu@usal.es

RESUMEN: El objetivo principal fue diseñar y realizar una práctica de la asignatura "Atención Farmacéutica" de 4º curso del Grado en Farmacia, compatibilizando el aprendizaje con la prestación de un servicio de atención farmacéutica a personas mayores. Como objetivo secundario se planteó estudiar la adherencia de los participantes a sus tratamientos.

En el curso 2022/2023 se diseñó la práctica y se ensayó con 20 estudiantes voluntarios como un proyecto de Aprendizaje-Servicio. En 2023/2024 se implementó en el programa de la asignatura participando los 61 estudiantes matriculados. En total, se realizaron 8 visitas a centros de día, coordinadas a través del Programa de Acercamiento Intergeneracional del Servicio de Asuntos Sociales de la USAL.

Participaron 141 personas mayores que respondieron de forma positiva a la actividad, apreciando su utilidad y expresando su interés en más iniciativas de este tipo. Se consideraron adherentes el 57 % de los participantes. Contestaron la encuesta anónima de satisfacción 41 estudiantes, considerando más del 80% la experiencia beneficiosa, a nivel personal y académico.

La actividad diseñada ha demostrado ser viable y cumplir con los objetivos planteados. La satisfacción de los estudiantes, personas mayores, profesores y coordinadoras de los centros resalta la importancia de este tipo de iniciativas.

*Palabras clave*: atención farmacéutica; adherencia terapéutica; educación sanitaria; personas mayores.

ABSTRACT: The main objective was to design and implement a practical component of the subject "Pharmaceutical Care" for 4th-year Pharmacy students, combining learning with the provision of pharmaceutical care services for elderly people. A secondary objective was to assess participants' adherence to their treatments.

In the 2022/2023 academic year, the practice was designed and tested with 20 volunteer students as a Service-Learning project. In 2023/2024, it was incorporated in the subject program with the participation of the 61 enrolled students. In total, 8 visits to day centers were conducted, coordinated through the Programa de Acercamiento Intergeneracional of the USAL Social Affairs Service.

A total of 141 elderly individuals participated, responding positively to the activity, appreciating its usefulness and expressing their interest in more initiatives of this kind. Of the participants, 57% were considered adherent to their treatments. Forty-one students answered the anonymous satisfaction survey, with more than 80% deeming the experience beneficial, both personally and academically.

The designed activity has proven feasible and successful in achieving the objectives set. The satisfaction of students, elderly participants, teachers and day center coordinators highlights the value of this type of initiative.

*Keywords*: pharmaceutical care; treatment adherence; health education; elderly people.

## 1. Introducción

La atención farmacéutica es una práctica profesional en la que el farmacéutico se responsabiliza de las necesidades del paciente relacionadas con los medicamentos. Implica la cooperación con el médico y otros profesionales sanitarios para conseguir resultados que mejoren la calidad de vida del paciente, así como su intervención en actividades que mejoren la salud y prevengan las enfermedades (Sociedad Española de Farmacia Clínica, Familiar y Comunitaria, 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la adherencia como "el grado en el que la conducta de un paciente, en relación con la toma de medicación, el seguimiento de una dieta o la modificación de hábitos de vida se corresponde con las recomendaciones acordadas con el profesional sanitario" (Pan American

Health Organization, 2003). El término "adherencia" implica una colaboración activa entre el paciente y el profesional sanitario en la toma de decisiones que afectan a su salud.

En países desarrollados, el porcentaje de adherencia al tratamiento en enfermedades crónicas es del 50% (Pan American Health Organization, 2003), es decir, 1 de cada 2 pacientes no sigue correctamente con sus tratamientos. La falta de adherencia farmacoterapéutica constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial y se ha relacionado con una disminución de la calidad y esperanza de vida. Esto ocasiona un peor control de las enfermedades, así como un aumento del número de pruebas, consultas y hospitalizaciones.

La falta de adherencia es una cuestión compleja ya que está condicionada por diferentes factores relacionados entre sí, como el desconocimiento de las enfermedades, la duración y/o complejidad de los tratamientos o la relación con los profesionales de la salud. Todos estos factores se ven aumentados en las personas mayores, por sus características y vulnerabilidad (Ortega et al., 2018; Rodríguez et al., 2014).

El farmacéutico juega un papel fundamental en la educación para la salud en torno al uso del medicamento y, por tanto, en la mejora de la adherencia farmacoterapéutica de los pacientes. Debido a esto y a la importancia de una correcta adherencia terapéutica, los estudiantes del Grado en Farmacia deben entrenar habilidades de comunicación con el paciente y conocer las estrategias de mejora de la adherencia durante su formación.

Así mismo, la universidad tiene la responsabilidad de formar profesionales comprometidos con su entorno, y de trasmitirles una responsabilidad social y un compromiso ético. Por esto, es tan beneficioso que el estudiante trabaje y aprenda sobre necesidades reales de su entorno, y que preste un servicio a la comunidad sin ánimo de lucro y con el objetivo de mejorarla. Debido a esto, se ha planteado conjugar el aprendizaje de los estudiantes y la prestación de un servicio, seleccionándose, en concreto, un grupo de personas mayores.

## 2. Objetivos

Diseñar y realizar una actividad de atención farmacéutica dirigida a personas mayores que acuden a centros de día de la ciudad de Salamanca con la participación de estudiantes de la asignatura "Atención Farmacéutica" de 4º de Farmacia. Con el doble propósito de prestar un servicio de educación para la salud a estas personas y de contribuir al desarrollo de habilidades de comunicación con el paciente, enfocadas en la mejora de la adherencia farmacoterapéutica, en los estudiantes.

Objetivo secundario: conocer el comportamiento de las personas mayores que participaron en la actividad en cuanto a la adherencia a sus tratamientos farmacológicos.

## 3. Materiales y métodos

La actividad se ha organizado los cursos 22/23 y 23/24 a través del Programa de Acercamiento Intergeneracional del Servicio de Asuntos Sociales (SAS) de la USAL. El SAS facilitó el contacto con las directoras de los centros para ofrecer la actividad, conseguir los permisos y fijar fechas. Los centros elegidos fueron Centros de día de Cáritas y Centros de día de la Gerencia de Servicios Sociales de la Junta de Castilla y León, ubicados en la ciudad de Salamanca.

Durante el curso 22/23, la actividad se realizó como prueba piloto con dos grupos de 10 estudiantes voluntarios de la asignatura, visitándose los centros "San Juan de Mata" y "Prosperidad". El curso 23/24 se ha realizado como práctica de la asignatura para los 61 alumnos matriculados, visitándose los centros "San Juan de Mata", "Cáritas San Mateo", "Salamanca", "Cáritas Barrio San José" y "Prosperidad".

Se programaron 10 horas presenciales y 10 horas de trabajo autónomo de los estudiantes para preparar la visita a los centros y todo el material necesario. Además, siguiendo la programación de la asignatura, se trabajó sobre mejora de la adherencia terapéutica y la comunicación con el paciente.

Se formaron 2 grupos de estudiantes el primer año y 6 grupos el segundo. Cada grupo trabajó para organizar una de las visitas, consensuándose entre estudiantes y organizadores su desarrollo. Las sesiones se estructuraron en 45 min aproximadamente de actividades con todos los participantes y otros 45 de entrevistas individuales a los participantes. Todo el material preparado por los estudiantes se subía como tarea a STUDIUM para su corrección por los profesores. Previamente a las visitas se realizaron ensayos de todo el desarrollo.

A los centros acompañaban a los estudiantes los profesores de la asignatura, la responsable del Programa de Acercamiento Intergeneracional del SAS y la estudiante de TFG.

Tras finalizar cada visita se preguntaba a las personas mayores si la actividad les había resultado útil, si habían tomado conciencia de la importancia de ser adherentes para mejorar su salud, y, si les gustaría que se hiciesen más actividades. Posteriormente, desde el SAS recababan la opinión de las coordinadoras de los centros.

Se diseñó una encuesta de satisfacción anónima para conocer la opinión de los estudiantes sobre el desarrollo de la actividad y sobre lo que representaba para su propia formación.

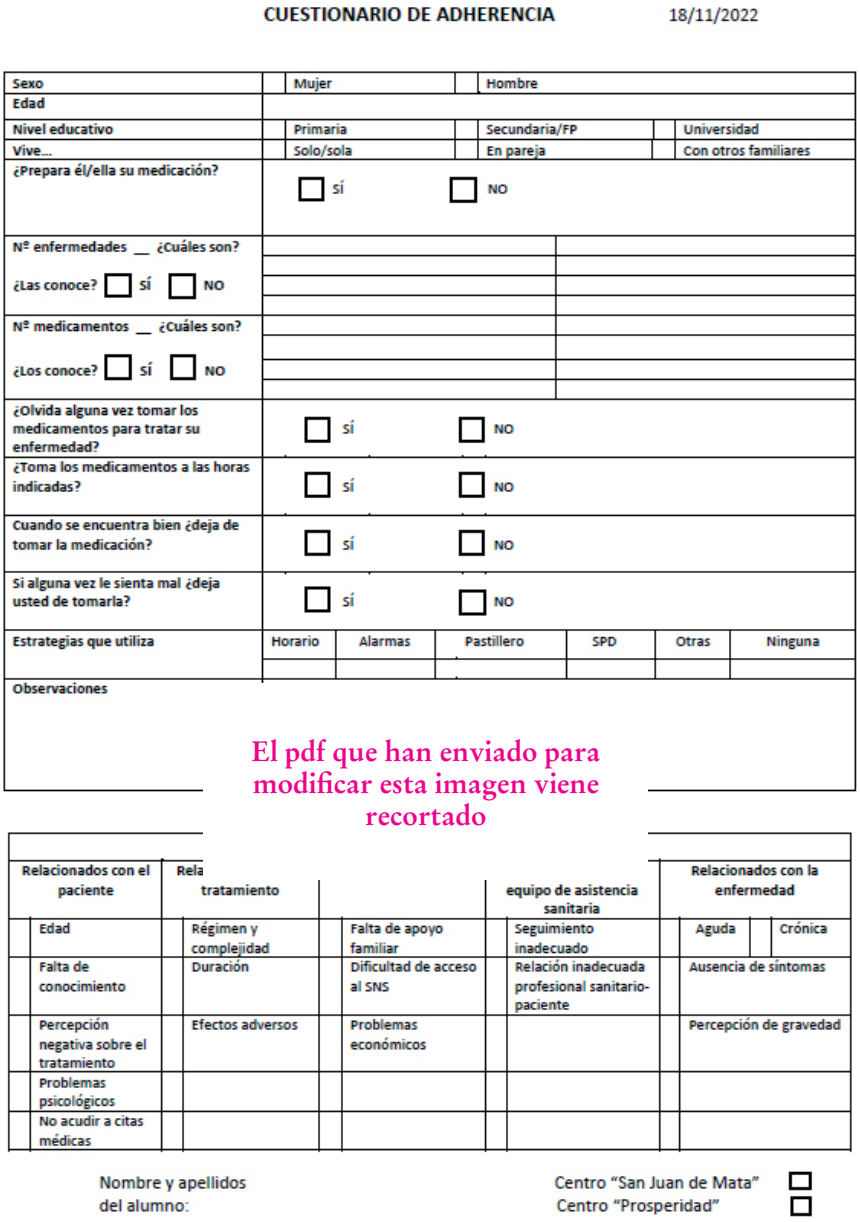
## 4. Resultados y discusión

Con antelación a la visita, se expusieron en los tablones de anuncio de los centros carteles confeccionados por cada grupo de estudiantes para anunciar el evento y captar participantes (figura 1). Para poder participar en la actividad, las personas debían apuntarse en sus propios centros. Así, las directoras de cada centro podían controlar el número de personas que iban a participar en la actividad.

Figura 1. *Carteles confeccionados por alumnos de 4º curso de Farmacia de la asignatura "Atención Farmacéutica".*

La sesión comenzaba con el saludo y presentación de la actividad a todos los participantes. Seguía una breve introducción con diapositivas en PowerPoint de conceptos sencillos relacionados con la utilización de medicamentos, adherencia y falsos mitos.

Tras esta presentación, los estudiantes, procedían a simular situaciones cotidianas que se dan en las farmacias y en las que los propios participantes podían sentirse identificados. Representando unos estudiantes el papel de farmacéutico y otros el de paciente. Durante estas simulaciones se realizaban preguntas abiertas a los participantes para conocer su opinión sobre lo que se estaba representando: si eran situaciones que habían vivido, o si ellos también tenían las mismas dudas del "paciente". Para reforzar las ideas claves que se habían intentado exponer, se realizaba un concurso con preguntas verdadero/falso, comentando las respuestas correctas.



**CUESTIONARIO DE ADHERENCIA** 18/11/2022

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sexo | | Mujer | | Hombre | | | | | | | |
| Edad | | | | | | | | | | | |
| Nivel educativo | | Primaria | | Secundaria/FP | | Universidad | | | | | |
| Vive... | | Solo/sola | | En pareja | | Con otros familiares | | | | | |
| ¿Prepara él/ella su medicación? | ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | |
| Nº enfermedades __ ¿Cuáles son? ¿Las conoce? ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | | |
| Nº medicamentos __ ¿Cuáles son? ¿Los conoce? ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | | |
| ¿Olvida alguna vez tomar los medicamentos para tratar su enfermedad? | ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | |
| ¿Toma los medicamentos a las horas indicadas? | ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | |
| Cuando se encuentra bien ¿deja de tomar la medicación? | ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | |
| Si alguna vez le sienta mal ¿deja usted de tomarla? | ☐ SÍ ☐ NO | | | | | | | | | | |
| Estrategias que utiliza | Horario | | Alarmas | | Pastillero | | SPD | | Otras | | Ninguna |
| Observaciones | | | | | | | | | | | |

El pdf que han enviado para modificar esta imagen viene recortado

| Relacionados con el paciente | Rela tratamiento | | equipo de asistencia sanitaria | Relacionados con la enfermedad |
|---|---|---|---|---|
| ☐ Edad | ☐ Régimen y complejidad | ☐ Falta de apoyo familiar | ☐ Seguimiento inadecuado | ☐ Aguda ☐ Crónica |
| ☐ Falta de conocimiento | ☐ Duración | ☐ Dificultad de acceso al SNS | ☐ Relación inadecuada profesional sanitario-paciente | ☐ Ausencia de síntomas |
| ☐ Percepción negativa sobre el tratamiento | ☐ Efectos adversos | ☐ Problemas económicos | | ☐ Percepción de gravedad |
| ☐ Problemas psicológicos | | | | |
| ☐ No acudir a citas médicas | | | | |

Nombre y apellidos del alumno:

Centro "San Juan de Mata" ☐
Centro "Prosperidad" ☐

FIGURA 2. *Cuestionario de adherencia elaborado para las entrevistas individuales a las personas mayores.*

Posteriormente, se pasaba a las entrevistas individuales con los participantes. Se realizaba una entrevista semiestructurada en las que, con preguntas sencillas, se valoraba la actitud de los participantes ante su medicación, con el fin de deducir el nivel de conocimiento de sus tratamientos y enfermedades, posibles barreras a superar para mejorar la adherencia y concluir, en la medida de lo posible, si eran adherentes o no. Para guiar la entrevista y recoger los datos anónimos de los participantes se utilizaba un cuestionario (figura 2). Este cuestionario incluía el Test de Morisky-Green (Pagès-Puigdemont y Valverde-Merino, 2018), que es el más validado y utilizado para la medida de la adherencia y plantea las siguientes preguntas:

- ¿Olvida alguna vez tomar los medicamentos para tratar su enfermedad?
- ¿Toma los medicamentos a las horas indicadas?
- Cuando se encuentra bien, ¿deja de tomar la medicación?
- Si alguna vez le sienta mal, ¿deja usted de tomarla?

Para considerar adherente a un paciente, las respuestas a estas preguntas deben ser: NO/SÍ/NO/NO.

Además, en la entrevista se entregaba un horario (Cruz Roja Española, 2010) para cumplimentar con los medicamentos que tomaba cada uno y un díptico informativo (Institute for Safe Medication Practices Canada, 2016).

Terminadas las entrevistas, para finalizar la actividad y despedirse, se resumían las ideas fundamentales, agradeciendo la asistencia.

Participaron en la actividad 141 mayores de forma voluntaria (80% mujeres y 20% hombres), que accedieron a la recogida anónima de sus datos. Un 92% afirmaron preparar ellos mismos su medicación. La alta inscripción de participantes, que en algunos centros superó el límite previsto, indica la buena acogida por los mayores.

Contestaron 41 estudiantes a la encuesta de satisfacción (figura 3), considerando más del 80% que había sido una experiencia beneficiosa, tanto a nivel personal como académico y afirmando haber ampliado sus conocimientos sobre adherencia terapéutica y haber podido entrenar habilidades de comunicación con pacientes.

El agradecimiento expresado por los mayores al acabar la actividad y el interés de que volvieran los estudiantes a realizar otra actividad resultó lo más gratificante para ellos. Las coordinadoras de los centros ratificaron como positiva la experiencia y expresaron su disposición a volver a recibir en el centro a los estudiantes.

Los datos obtenidos a partir de los cuestionarios cumplimentados en las entrevistas individuales con las personas mayores no fueron suficientemente fiables como para extraer conclusiones sobre la adherencia de los participantes. Las principales limitaciones se debieron a la general falta de entrenamiento de los entrevistadores (81 estudiantes) y su diferente dominio del esquema de la entrevista. Además, no se

pidió a los participantes documentación sobre sus tratamientos y muchos de ellos no recordaban sus patologías, ni sus tratamientos. El porcentaje de participantes que conocía su medicación fue un 46.4% de hombres y un 53.1% de mujeres. Esta falta de conocimiento del paciente sobre sus patologías y medicación, sumado a la complejidad de tratamiento en este grupo de la población, da lugar a una elevada falta de adherencia. La complejidad de los tratamientos en estos pacientes, en muchos casos, es inevitable dado que son pacientes pluripatológicos y polimedicados. Sin embargo, mediante este tipo de actividades sí podemos intentar mejorar la falta de información, de forma directa, durante las sesiones, o indirectamente, animándolos a consultar a otros profesionales de la salud.

Figura 3. *Resultados de la encuesta de satisfacción a los estudiantes.*

A pesar de las limitaciones en la recogida de datos y el carácter modesto de la intervención, a partir del Test de Morisky-Green se ha obtenido un porcentaje de pacientes adherentes del 57.4%, dato que coincide con el proporcionado por la OMS, citado anteriormente. Es decir, aproximadamente, 1 de cada 2 participantes no cumplía correctamente con su tratamiento, lo cual reafirma la necesidad de información y educación para la salud en este grupo de población entorno al uso adecuado de la medicación.

## 5. Conclusión

Se ha diseñado e implementado una actividad práctica que compatibiliza el aprendizaje de los estudiantes de la asignatura "Atención farmacéutica" de 4º curso del Grado de Farmacia y la prestación de un servicio a la sociedad, en este caso, a personas mayores autónomas. Se ha realizado una prueba piloto de la actividad y, posteriormente, se ha llevado a cabo en las condiciones habituales

de la asignatura, demostrándose su viabilidad. Se ha podido constatar la falta de adherencia de los participantes a sus tratamientos y la necesidad de educación sanitaria, lo que justifica prestar el servicio propuesto.

La satisfacción de estudiantes, participantes, coordinadoras de los centros y profesores permite valorar positivamente la actividad.

## 6. Bibliografía

Cruz Roja Española. Ser cuidador/a. Cuaderno/guía [Internet]. España: Cruz Roja Española; 2010 [citado 14 mayo 2024] Disponible en: https://www.cruzroja.es/principal/documents/18236/1923485/Cruz-Roja-Cuaderno-Guia-Ser-Cuidador.pdf

Institute for Safe Medication Practices Canada. Cinco preguntas que debe hacer sobre sus medicamentos cuando esté con su médico, enfermera o farmacéutico [Internet]. Canadá: © ISMP Canada; 2016 [citado 14 mayo 2024]. Disponible en: https://www.ismp-canada.org/download/MedRec/5questions/MedSafetyposter-Spanish.pdf

Ortega JJ, Sánchez D, Rodríguez OA, Ortega JM. Adherencia terapéutica: un problema de atención médica. Acta méd. Grupo Ángeles [Internet]. 2018 [citado 14 mayo 2024]; 16(3): 226-232. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-72032018000300226

Pagès-Puigdemont N, Valverde-Merino MI. Métodos para medir la adherencia terapéutica. Ars Pharm. 2018; 59(3):163-72. Disponible en: https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/7387

Pan American Health Organization. Adherencia a los tratamientos a largo plazo: pruebas para la acción [Internet]. Suiza: © Organización Mundial de la Salud; 2003 [citado 12 mayo 2024]. Disponible en: https://www3.paho.org/spanish/ad/dpc/nc/adherencia-largo-plazo.pdf

Rodríguez MA, Pérez EM, García JE, Rodríguez CA, Martínez MF, Faus DM. Revisión de estrategias utilizadas para la mejora de la adherencia al tratamiento farmacológico. *Pharm Care España.* 2014; 16(3): 110-120. Disponible en: https://www.pharmcareesp.com/index.php/PharmaCARE/article/view/176

Sociedad Española de Farmacia Clínica, Familiar y Comunitaria. Informe de evaluación del impacto clínico, humanístico y económico del servicio de indicación farmacéutica en el ámbito de la farmacia comunitaria [Internet]. España: ©Los editores; 2019 [citado 12 mayo 2024]. Disponible en: https://www.sefac.org/system/files/2022-02/INDICA%2BPRO_Informe.pdf

ISSN electrónico: 2445-1355
DOI: https://doi.org/10.14201/fj2024924150

# PREDICCIÓN DEL DAÑO RENAL ASOCIADO A LOS INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL INMUNITARIO EN PACIENTES ONCOLÓGICOS

## *Prediction of Immune Checkpoint Inhibitors-Associated Renal Damage in Oncology Patients*

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

Área de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

*Correo-e: martapv@usal.es

RESUMEN: En las últimas décadas, los inhibidores del punto de control inmunitario (ICIs) han revolucionado el tratamiento del cáncer, aunque su eficacia se ve afectada por efectos adversos como la nefrotoxicidad, impactando negativamente el pronóstico. Nuestra hipótesis sugiere que los ICIs podrían producir daño renal subclínico, no evidenciado por pruebas clínicas habituales. El objetivo del trabajo fue estudiar la aplicación de biomarcadores urinarios en el diagnóstico temprano del daño renal asociado a los ICIs. Se realizó un estudio prospectivo en el que se reclutaron pacientes tratados con ICIs o con terapia combinada ICIs/quimioterapia. Se realizó un seguimiento de los pacientes durante 12 ciclos de tratamiento y se recogieron muestras de orina antes de iniciar el tratamiento, así como antes y después del tercer ciclo. Los pacientes se clasificaron en "casos" (si durante el tratamiento desarrollaban daño renal, según criterio KDIGO y/o aparecían alteraciones electrolíticas compatibles con el tratamiento con ICIs) y "controles" (pacientes sin daño renal durante el estudio). Se determinaron los biomarcadores A, B, C, D y E mediante la técnica de ELISA. Nuestros resultados evidenciaron una excreción significativa de A y B antes de recibir el tercer ciclo en los casos respecto a los controles.

Además, se observó una tendencia de mayor excreción de C y D, incluso antes de recibir la terapia. Por tanto, estos biomarcadores podrían predecir el daño renal producido por los ICIs permitiendo un manejo preventivo y personalizado del paciente.

*Palabras clave*: biomarcadores urinarios; diagnóstico; inhibidores del punto de control inmunitario (ICIs); nefrotoxicidad; riesgo; quimioterapia.

ABSTRACT: In recent decades, immune checkpoint inhibitors (ICIs) have revolutionized cancer treatment, although their efficacy is affected by adverse effects such as nephrotoxicity, negatively impacting prognosis. Our hypothesis suggests that ICIs could produce subclinical renal damage, not evidenced by usual clinical tests. The aim of this work was to study the application of urinary biomarkers in the early diagnosis of renal damage associated with ICIs. A prospective study was carried out in which patients treated with ICIs or with combined ICIs/chemotherapy were enrolled. Patients were followed for 12 treatment cycles and urine samples were collected before starting treatment, as well as before and after the third cycle. Patients were classified into "cases" (if during treatment they developed renal damage, according to KDIGO criteria and/or electrolyte alterations compatible with treatment with ICIs appeared) and "controls" (patients without renal damage during the study). Biomarkers A, B, C, D and E were determined by ELISA. Our results showed a significant excretion of A and B before receiving the third cycle in cases compared to controls. In addition, a trend of increased excretion of C and D was observed, even before receiving therapy. Therefore, these biomarkers could predict the renal damage produced by ICIs allowing a preventive and personalized management of the patient.

*Keywords:* urinary biomarkers; diagnosis; immune checkpoint inhibitors (ICIs); nephrotoxicity; chemotherapy.

## 1. Introducción

El tratamiento del cáncer ha experimentado grandes avances en las últimas décadas gracias a la inmunoterapia, cuyos agentes más ampliamente utilizados son los inhibidores del punto de control inmunitario (ICIs); los cuales potencian la inmunidad natural del organismo (Seidel *et al.*, 2018).

Los puntos de control inmunitario son receptores fundamentales en la limitación de la respuesta inmunitaria exacerbada, principalmente en células T y previene de la autoinmunidad del organismo bajo condiciones fisiológicas (Seidel *et al.*, 2018). Estos son; el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y su ligando PD-L1 (Bagchi *et al.*, 2021). Las células T CD4+ se activan por la interacción de los antígenos tumorales presentes en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígenos (Francis, Thomas, 2017). Esta activación está mediada, conjuntamente, por la interacción de los ligandos CD80/CD86 en la APC y CD28 en el TCR. CTLA-4 muestra mayor afinidad por CD80/86 en comparación con CD28, induciendo señales inhibitorias en la célula (Seidel *et al*., 2018) . Por otro lado, la señalización de PD-1 puede ser activada por la unión a su ligando PD-L1, expresado en la superficie de las células tumorales desencadenando una señalización inhibitoria (He, Xu, 2020). Sin embargo, las células tumorales han integrado mecanismos de evasión inmunitaria como la expresión de PD-1 o PD-L1 para seguir proliferando (de Francisco *et al.*,2019).

Los ICIs son anticuerpos monoclonales, en su mayoría, inmunoglobulinas humanas o humanizadas. Su mecanismo de acción consiste en la interacción inhibitoria de los puntos de control, conduciendo a una activación linfocitaria y de la actividad antitumoral.

Los ICIs presentan grandes beneficios terapéuticos, aunque se suele asociar a su uso un número considerable de efectos adversos inmunomediados (EAI) (Poto *et al*., 2022). Puede estar afectado casi cualquier órgano, siendo los EAI más frecuentes la erupción cutánea, diarrea, hepatitis, pancreatitis y tiroiditis, entre otros. El riñón es uno de los órganos afectados. Los estudios más recientes teorizan una incidencia de nefrotoxicidad del 13-29% (Miao *et al.*, 2022; Wanchoo *et al.,* 2017). La complicación más común es el daño renal agudo (DRA) (Rao *et al.*, 2023), consecuencia de una nefritis tubulointersticial aguda (NTIA) en el 90% de los casos (Herrmann, Perazella, 2020). Generalmente, el tiempo de aparición es de 2-3 meses tras iniciar el tratamiento (Wanchoo *et al.,* 2017). Además, se han identificado diversas lesiones glomerulares y alteraciones electrolíticas vinculadas a los ICIs, que afectan a la homeostasis iónica. La alteración más frecuente es la hiponatremia (Alonso *et al.*, 2023). El manejo clínico de la nefrotoxicidad implica la suspensión del tratamiento con ICIs, la administración de corticosteroides y descartar otras causas posibles (Rao *et al.*, 2023).

El diagnóstico está basado en los cambios en la concentración de creatinina sérica, que se utiliza para estadificar a los pacientes según los criterios KDIGO (Tinawi *et al.*, 2020) Sin embargo, para que este marcador se altere en plasma, tiene que producirse una disminución del 50% del filtrado glomerular. Para confirmar el diagnóstico, se requiere una biopsia renal, una técnica invasiva y no exenta de

complicaciones asociadas (Shingarev, Glezerman, 2019). Los marcadores diagnósticos actuales presentan limitaciones, son inespecíficos y únicamente indicativos del daño ya establecido.

En los últimos años, consecuencia de las limitaciones actuales en el diagnóstico, se están validando una batería de biomarcadores urinarios con potencial utilidad diagnóstica en el daño renal. Algunos marcadores en estudio son KIM-1 (molécula de daño renal 1) y NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos) sensibles en DRA o TIMP-2 (inhibidor tisular de metaloproteinasas 2) involucrada en la remodelación del tejido extracelular, cuya elevación puede reflejar respuestas celulares al estrés o daño en el tejido renal. La presencia de albúmina en la orina sugiere daño glomerular, mientras que de transferrina puede indicar tanto daño tubular como glomerular (Seijas *et al.*, 2017). Otros ejemplos son RBP (Proteína de Unión al Retinol) o IGFBP-7 (Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 7).

## 2. Hipótesis y objetivo

La nefrotoxicidad es uno de los efectos adversos asociados al tratamiento con ICIs cuyo diagnóstico presenta limitaciones significativas. En este contexto, es fundamental desarrollar nuevos enfoques diagnósticos que faciliten la detección precoz del daño. La hipótesis de investigación se centra en la existencia de un daño renal subclínico asociado al tratamiento con ICIs, no evidenciado con pruebas clínicas convencionales. La utilización de nuevos biomarcadores urinarios como herramienta diagnóstica permitiría detectar dicho daño renal subclínico y manejar a estos pacientes de manera preventiva y personalizada.

El objetivo de este estudio fue validar una serie de biomarcadores urinarios como herramientas diagnósticas para la detección temprana de daño renal asociado a los ICIs.

## 3. Material y métodos

El estudio respeta las Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Ha sido aprobado por el Comité Ético de los hospitales implicados. Todos los pacientes participaron voluntariamente y recibieron por escrito la información detallada; además de firmar los consentimientos informados.

Se realizó un estudio prospectivo de tipo casos y controles, en el que se reclutaron pacientes tratados con ICIs de Oncología Médica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. El reclutamiento se realizó entre enero-2021 y diciembre-2023 con unos criterios de inclusión. Se recogieron muestras de orina de los pacientes en tres tiempos diferentes; Basal (previo a comenzar el tratamiento), Pre-3 (antes del tercer ciclo) y Post-3 (7 días después de administrar el tercer ciclo). La manipulación

y conservación de las muestras (-80 ºC) tuvo lugar en el Biobanco del CAUSA o en el propio Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Valladolid. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al laboratorio de la Unidad de Teranóstica de Enfermedades Renales y Cardiovasculares del IBSAL, manteniendo la cadena de frío. En la "Hoja de datos del paciente" se recogieron los datos clínicos y antropométricos de cada paciente. A partir de las analíticas de los Servicios de Bioquímica, se recopiló la concentración plasmática de creatinina, electrolitos (sodio, potasio, calcio, magnesio) y la tasa de filtrado glomerular (TFG).

Los pacientes se clasificaron en dos grupos: casos y controles. Se consideraron "Casos" a aquellos pacientes que cumplieron durante los doce primeros ciclos, al menos, uno de los criterios siguientes:

- Un descenso de la TFG <60 ml/min/1,73 $m^2$.
- Incremento de creatinina plasmática de 1,5 veces [≥0,3 mg/dL] (según criterios KDIGO) con respecto al valor basal.
- ≥2 alteraciones electrolíticas compatibles con daño renal causado por ICIs. Tanto la hipermagnesemia como la hipernatremia no aplican al criterio, según bibliografía (Uppal *et al.*, 2022).

Por otro lado, se consideraron "Controles" a los pacientes que no cumplieron los criterios establecidos.

La determinación cuantitativa de los biomarcadores urinarios se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tipo sándwich. Una vez transcurridas las seis etapas de la técnica, se midió la absorbancia de cada muestra mediante espectrofotometría. Las concentraciones de los biomarcadores se calcularon interpolando los valores de absorbancia en una curva de cuatro parámetros generada con concentraciones conocidas de las proteínas estudiadas.

El ajuste por creatinina urinaria se realiza para normalizar la concentración de los biomarcadores estudiados en la orina, compensando las variaciones en la diuresis y otras diferencias fisiológicas entre individuos. Para su determinación se utilizó el método de Jaffé, que se fundamenta en la formación de un complejo de color rojo (complejo de Janovsky) resultado de la reacción en medio alcalino entre el ácido pícrico y la creatinina. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra, calculada mediante interpolación de la absorbancia obtenida en una recta patrón.

Los datos y las concentraciones de los biomarcadores urinarios se recopilaron en una base de datos con Microsoft® Excel®. La excreción de cada biomarcador se representó gráficamente como diagrama de cajas y bigotes (box-plot) utilizando Microsoft® Excel®. Respecto al análisis estadístico de los datos, se utilizó IBM® SPSS® Statistics. En primer lugar, se aplicó la Prueba de Grubbs para eliminar valores atípicos. Las variables cualitativas se analizaron con la Prueba de Chi-Cuadrado de Pearson. Se realizaron dos tipos de análisis: comparación

entre controles y casos en el mismo tiempo de muestreo y comparación de cada grupo de estudio entre los distintos tiempos de muestreo. Se realizó una prueba de normalidad (test de Shapiro-Wilk n<50). Los datos que seguían una distribución normal se analizaron con la Prueba T para muestras independientes y aquellos no normales se analizaron con la Prueba U de Mann-Whitney. Cuando se analizaron más de dos grupos, se sometieron a un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de Scheffe como análisis post-hoc. Para los valores no normales, se utilizó el test de Kruskall-Wallis para comparar medianas y la prueba post-hoc de Bonferroni para identificar diferencias significativas. El nivel de significación considerado durante el análisis bioestadístico para reflejar diferencias estadísticamente significativas entre grupos fue p<0,05.

## 4. Resultados y discusión

Las características individuales de los pacientes fueron estadísticamente similares en ambos grupos (Tabla 1), por lo que no se puede atribuir las diferencias en la excreción urinaria a ninguno de ellos.

Tabla 1. Características iniciales de los pacientes incluidos en el estudio. Los datos se expresan como porcentaje (variables cualitativas) o media ± error estándar de la media (variables cuantitativas). [IMC: índice de masa corporal, TFG: tasa de filtrado glomerular].

| **Grupo** *(N=44)* | **Edad (años)** | **Peso (kg)** | **Talla (m)** | **IMC (kg/m2)** | **Género** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | **Masculino** | **Femenino** |
| **Control** *(n=25)* | *66,15 ± 1,09* | *70,69 ± 1,73* | *1,66 ± 0,01* | *25,76 ± 0,55* | *69,2%* | *30,8%* |
| **Caso** *(n=19)* | *65,42 ± 1,29* | *70,61 ± 1,88* | *1,68 ± 0,01* | *25,00 ± 0,72* | *68,4%* | *31,6%* |

Los parámetros bioquímicos, se encuentran en rangos de normalidad en ambos grupos a tiempos Basal y Pre-3 *(Tabla 1)*, por lo tanto, no reflejan un posible daño renal en los pacientes sometidos al tratamiento. Sin embargo, aunque los parámetros bioquímicos no muestren alteraciones, no se puede descartar la presencia de daño renal. Las diferencias en la excreción se deben a la clasificación establecida en el estudio.

Tabla 2. Parámetros bioquímicos de los pacientes incluidos en el estudio.
**Significación p<0,05 vs control*

| **Grupo** *(N=44)* | **Control** *(n=25)* | | **Caso** *(n=19)* | |
|---|---|---|---|---|
| **Tiempo** | *Basal* | *Pre-3* | *Basal* | *Pre-3* |
| **Creatinina plasmática (mg/dL)** | *0,82 ± 0,03* | *0,79 ± 0,03* | *0,88 ± 0,06* | *0,88 ± 0,05* |
| **TFG (ml/min/ 1,73 m2)** | *82,85 ± 1,50* | *84,33 ± 1,51* | *77,00 ± 2,77* | *77,00 ± 2,87* |
| **Calcemia (mg/dL)** | *9,53 ± 0,06* | *9,40 ± 0,06* | *9,35 ± 0,08* | *9,37 ± 0,07* |
| **Magnesemia (mg/dL)** | *1,90 ± 0,03* | *1,78 ± 0,04* | *1,73 ± 0,08* | *1,66 ± 0,06* |
| **Potasemia (mmol/L)** | *4,48 ± 0,07* | *4,49 ± 0,05* | *4,49 ± 0,09* | *4,59 ± 0,10* |
| **Natremia (mmol/L)** | *140,25 ± 0,29* | *140,81 ± 0,30* | *139,28 ± 0,40* | *138,69 ± 0,45** |

En primer lugar, se encontraron diferencias significativas entre grupos en la excreción del biomarcador A antes de recibir el tercer ciclo, y de B antes y después del ciclo 3 *(Figura 1)*. Este aumento en la excreción renal del biomarcador permitiría identificar el daño renal subclínico una vez iniciado el tratamiento con ICIs, por lo que monitorizar sus niveles a lo largo del tratamiento se podría utilizar como herramienta diagnóstica en el manejo preventivo del paciente.

Por otro lado, en los biomarcadores C, D y E se observó una tendencia de mayor excreción en los casos; incluso antes de recibir la terapia *(Figura 1)*. Estos marcadores podrían predecir el riesgo individual de cada paciente antes de la administración del tratamiento. Este riesgo individual reflejaría un daño renal subclínico previo del paciente no evidenciado hasta el momento, provocado posiblemente por la exposición a contaminantes, fármacos nefrotóxicos, edad avanzada o enfermedades concomitantes, entre otras causas.

La excreción del panel de biomarcadores citados, en los muestreos en los que los parámetros clínicos se encuentran aún dentro de los rangos de normalidad, permitiría predecir el daño renal asociado a los ICIs de forma temprana. Por un lado, los biomarcadores A y B identificarían a los pacientes en riesgo una vez iniciado el tratamiento. Por su parte, los biomarcadores C, D y E conseguirían detectar a los pacientes con riesgo de sufrir daño renal incluso antes de iniciar la terapia. El abordaje de diagnóstico propuesto permitiría manejar al paciente de forma preventiva y personalizada y mejorar su pronóstico oncológico.

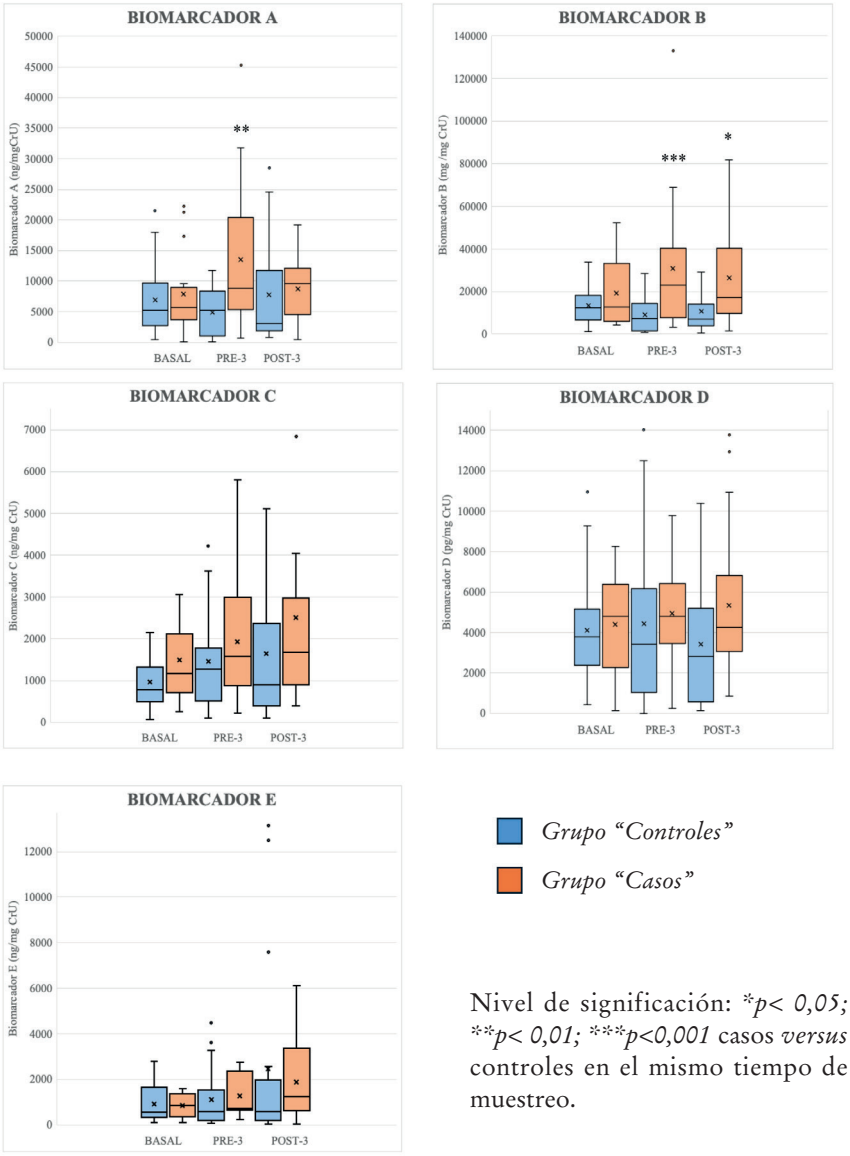



FIGURA 1. Diagrama *box-plot* de la excreción urinaria de cada uno de los biomarcadores de daño renal temprano en el estadio basal y en el momento previo (Pre-3) y posterior (Post-3) a la administración del tercer ciclo de tratamiento.

Este trabajo presenta ciertas limitaciones. El número de pacientes con el muestreo requeridos fue reducido. Sería necesario aumentar la muestra total (N) en estudios posteriores consolidar los resultados, aumentar la potencia estadística y asegurar la representatividad de la población.

## 5. Conclusiones

- Los biomarcadores A y B podrían predecir el daño renal asociado a los ICIs antes de recibir el tercer ciclo de tratamiento.
- Los biomarcadores C, D y E podrían utilizarse como biomarcadores de riesgo individual antes de recibir la terapia.
- Por tanto, estos biomarcadores podrían predecir el daño renal producido por los ICIs y en consecuencia permitirían manejar al paciente de forma preventiva y personalizada.

## 6. Bibliografía

Alonso F, Martín de Francisco ÁLM, Auñón P, García-Carro C, García P, Gutiérrez E, et al. Efectos renales adversos por inhibidores del check-point (ICP) en pacientes con cáncer. Recomendaciones del grupo de Onconefrología de la Sociedad Española de Nefrología (SEN). Nefrología. 2023;43(5):622-35.

Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2021;16(1): 223-49.

De Francisco ALM, Macía M, Alonso F, García P, Gutierrez E, Quintana LF, et al. Onco-Nefrología: cáncer, quimioterapia y riñón. Nefrología. 2019;39(5):473-81.

Francis DM, Thomas SN. Progress and opportunities for enhancing the delivery and efficacy of checkpoint inhibitors for cancer immunotherapy. Adv Drug Deliv Rev 2017;114:33-42.

He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. Cell Res. 2020;30(8):660-9.

Herrmann SM, Perazella MA. Immune Checkpoint Inhibitors and Immune-Related Adverse Renal Events. Kidney Int Rep. 2020;5(8):1139-48.

Miao J, Sise ME, Herrmann SM. Immune checkpoint inhibitor related nephrotoxicity: Advances in clinicopathologic features, noninvasive approaches, and therapeutic strategy and rechallenge. Front Nephrol. 2022;2.

Poto R, Troiani T, Criscuolo G, Marone G, Ciardiello F, Tocchetti CG, et al. Holistic Approach to Immune Checkpoint Inhibitor-Related Adverse Events. Front Immunol. 2022;13.

Rao Ullur A, Côté G, Pelletier K, Kitchlu A. Immunotherapy in oncology and the kidneys: a clinical review of the evaluation and management of kidney immune-related adverse events. Clin Kidney J. 2023;16(6):939-51.

Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. Front Oncol. 2018;8:86.

Seijas M, Baccino C, Nin N, Lorente JA. Definición y biomarcadores de daño renal agudo: nuevas perspectivas. Med Intensiva. 2014;38(6):376-85.

Shingarev R, Glezerman IG. Kidney Complications of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review. Am J Kidney Dis. 2019;74(4):529-37.

Tinawi M, Bastani B. Nephrotoxicity of Immune Checkpoint Inhibitors: Acute Kidney Injury and Beyond. Cureus [Internet]. 2020 [citado 15 de junio de 2024]; Disponible en: https://www.cureus.com/articles/37377-nephrotoxicity-of-immune-checkpoint-inhibitors-acute-kidney-injury-and-beyond

Uppal NN, Workeneh BT, Rondon-Berrios H, Jhaveri KD. Electrolyte and Acid-Base Disorders Associated with Cancer Immunotherapy. Clin J Am Soc Nephrol. 2022;17(6):922-33.

Wanchoo R, Karam S, Uppal NN, Barta VS, Deray G, Devoe C, et al. Adverse Renal Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Narrative Review. Am J Nephrol. 2017;45(2):160-9.

ISSN electrónico: 2445-1355
DOI: https://doi.org/10.14201/fj2024925161

# APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA LAMP (*LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION*) PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIONES POR *Schistosoma haematobium*

## *Application of LAMP technology (Loop-mediated isothermal amplification) for molecular diagnosis of Schistosoma haematobium infections*

Daniel MATEOS CARRIL; Beatriz CREGO-VICENTE; Manuel DIEGO DEL OLMO; Pedro FERNÁNDEZ-SOTO

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS). Grupo de Investigación e-INTRO (Enfermedades Infecciosas y Tropicales). IBSAL-CIETUS. Área de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Avda. Licenciado Méndez Nieto s/n, 37007, Salamanca, España

*Correo-e: pfsoto@usal.es

RESUMEN: *Schistosoma haematobium* (agente causal de la esquistosomosis genitorurinaria) afecta a 112 millones de personas en 54 países de África y Oriente. El diagnóstico de referencia es la observación microscópica de huevos del parásito en orina de pacientes, aunque con limitaciones. El diagnóstico serológico y molecular también presentan limitaciones y son difíciles de realizar en áreas endémicas. Una alternativa es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP. En estudios previos desarrollamos un método molecular basado en la tecnología LAMP para detectar ADN de *S. haematobium* (*Sh*-LAMP) con alta especificidad y sensibilidad. Aquí, evaluamos su funcionamiento en muestras de orina recolectadas en una zona endémica de esquistosomosis urogenital (Cubal, Angola). Seleccionamos 33 muestras de orina con análisis microscópico de campo: 14 negativas

y 19 positivas. Se extrajo el ADN y se analizaron mediante *Sh*-LAMP colorimétrico. Obtuvimos un resultado *Sh*-LAMP positivo (89,5%) en 17/19 muestras microscópicamente positivas y negativo en las 14 muestras microscópicamente negativas. La facilidad de uso e interpretación y el nivel de reproducibilidad de los resultados respecto a la microscopía, sugieren que el *Sh*-LAMP puede ser una herramienta eficaz para el diagnóstico molecular de la esquistosomosis urogenital y útil en estudios epidemiológicos de mapeo y control de la enfermedad.

*Palabras clave*: *Schistosoma haematobium;* esquistosomosis urogenital; LAMP; diagnóstico molecular; Cubal; Angola.

ABSTRACT*: Schistosoma haematobium* (the causative agent of genitorurinary schistosomiasis) affects 112 million people in 54 countries in Africa and the East. The gold standard diagnosis is microscopic observation of parasite eggs in urine of patients, although with limitations. Serological and molecular diagnosis also have limitations and are difficult to perform in endemic areas. An alternative is isothermal LAMP-type nucleic acid amplification. In previous studies we developed a molecular method based on LAMP technology to detect *S. haematobium* DNA (*Sh*-LAMP) with high specificity and sensitivity. Here, we evaluated its performance on urine samples collected in a urogenital schistosomiasis endemic area (Cubal, Angola). We selected 33 urine samples with field microscopic analysis: 14 negative and 19 positive. DNA was extracted and analysed by colorimetric *Sh*-LAMP. We obtained a positive *Sh*-LAMP result (89.5%) in 17/19 microscopically positive samples and negative in the 14 microscopically negative samples. The ease of use and interpretation and the level of reproducibility of the results with respect to microscopy suggest that *Sh*-LAMP can be an effective tool for molecular diagnosis of urogenital schistosomiasis and useful in epidemiological mapping and disease control studies.

*Keywords*: *Schistosoma haematobium;* urogenital schistosomiasis; LAMP; molecular diagnostic; Cubal; Angola.

## 1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la esquistosomosis es una enfermedad tropical desatendida causada por alguna de las seis especies de gusanos parásitos trematodos del género *Schistosoma* que afectan al hombre,

incluyendo: *Schistosoma haematobium* (esquistosomosis urogenital), *S. mansoni, S. intercalatum, S. japonicum, S. guineensis* y *S. mekongi* (esquistosomosis intestinal) (WHO, 2023). Está considerada la segunda mayor causa de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones parasitarias, solo después de la malaria (Beltran et al, 2008). La esquistosomosis es endémica en 79 países tropicales y subtropicales, especialmente en comunidades pobres sin agua potable ni saneamiento adecuado. Afecta a casi 250 millones de personas en el mundo (más del 90% en África subsahariana) y 779 millones viven en riesgo de infección. Aproximadamente, 112 millones de personas en 54 países de África y Oriente Medio sufren esquistosomosis urogenital causada por *S. haematobium*, siendo la especie de esquistosoma que más infecciones produce. Clínicamente, la esquistosomosis se manifiesta típicamente como una dermatitis cercariana, el síndrome agudo de Katayama y la esquistosomosis crónica. En la esquistosomosis urogenital la clínica más llamativa ocurre en la fase crónica, con la presencia de huevos del parásito en la pared de la vejiga, uréter y órganos genitales, produciendo hematuria. Las complicaciones incluyen fibrosis vesical, estenosis uretral e hidronefrosis. También cáncer de vejiga y, en las mujeres, infertilidad y embarazos ectópicos (Colley *et al*, 2014). El praziquantel es el tratamiento de elección para todas las formas de esquistosomosis (Colley *et al*, 2014; McManus et al, 2018).

El diagnóstico de referencia de la esquistosomosis urogenital es la observación directa de huevos en orina de pacientes mediante microscopía. Sin embargo, éste tiene limitaciones como la falta de sensibilidad (especialmente en infecciones leves), incapacidad de detección de infección aguda, etc. (Chala B, 2023). Los métodos serológicos también presentan problemas como la obtención de antígenos, reactividad cruzada, falsos positivos tras quimioterapia o incapacidad de detección en fase aguda (Hinz *et al*, 2017). Para solucionar estas limitaciones, existen métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), con elevada sensibilidad y especificidad diagnósticas, pero que requieren de infraestructura compleja, material costoso y personal especializado, por lo que no resultan útiles para el diagnóstico en zonas endémicas de esquistosomosis con escasos recursos. Una alternativa es la tecnología de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*). Esta técnica fue descrita en el 2000 por Notomi *et al.* (Notomi et al, 2000). Es un método de amplificación de ácidos nucleicos (ADN o ARN) a temperatura constante (60–65°C) por una *Bst* polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena junto con 4 o 6 *primers*/cebadores que reconocen entre 6 u 8 regiones en el ADN diana. La gran ventaja del método es que es posible la detección visual de los resultados por un simple cambio de color (Tomita *et al*, 2008), por lo que no requiere de equipos sofisticados y se puede realizar fácilmente en condiciones de campo en zona endémica de enfermedad. Un esquema y descripción de su funcionamiento se presenta en la Figura 1.

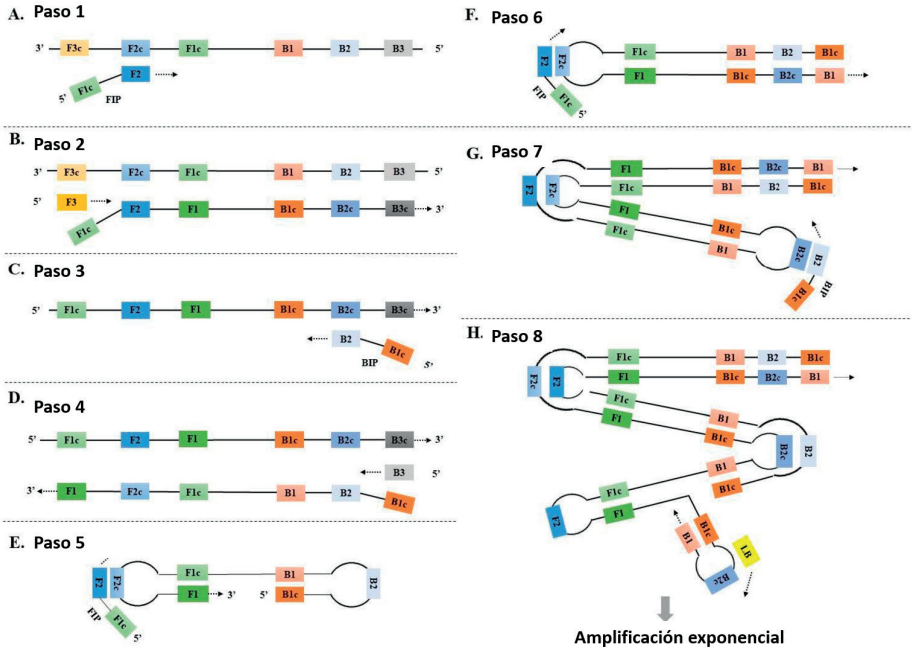



Figura 1. Esquema del funcionamiento de la tecnología LAMP. La amplificación LAMP consta de dos fases, una fase de amplificación inicial y una fase de amplificación exponencial. En la fase de amplificación inicial, los cebadores internos (FIP) se hibridan con el ADN diana e inician la síntesis de la cadena complementaria a la cadena 3'-5' (Figura 1A). Al mismo tiempo, los cebadores externos (F3) también inician la síntesis de ADN para desplazar las cadenas de ADN recién sintetizadas a partir de los cebadores internos (Figura 1B). El ADN monocatenario (ADNmc) liberado sirve como molde para la síntesis de ADN con los correspondientes cebadores internos (BIP) (Figura 1C) y externos (B3) (Figura 1D). El ADNmc liberado puede plegarse en una molécula con forma de mancuerna que sirve para iniciar la síntesis de ADN autocebado y como molde para nuevos ciclos de amplificación a través de los cebadores internos (Figura 1E-G). (Esquema tomado de Zhang *et al*, 2023, con modificaciones).

Angola es un país africano con aproximadamente 33 millones de habitantes, de los cuales casi la mitad son menores de 15 años. Se estima una tasa nacional de pobreza del 41%, sobrepasando el 90% en casi la mitad de sus municipios. Estudios previos han reportado una prevalencia oficial de esquistosomosis urogenital en Angola del 28%, mientras que la prevalencia de esquistosomosis intestinal

es casi residual en todo el país. Benguela es una de las 18 provincias angoleñas, clasificada como la segunda provincia con mayor prevalencia del país. En Cubal, un municipio de Benguela, se describió previamente una prevalencia de esquistosomosis urogenital del 61% entre los niños en edad escolar (Sánchez-Marqués *et al*, 2023a; Sánchez-Marqués *et al*, 2023b).

En el Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS (Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca) se diseñó un método LAMP para la detección sensible y específica de ADN de *S. haematobium* (*Sh*-LAMP) basado en una secuencia de 2522 pares de bases del espaciador intergénico ribosomal (Gandasegui *et al,* 2015). Este LAMP permitió detectar ADN del parásito en muestras de orina de pacientes en un estudio previo realizado en Cubal (Angola) (Gandasegui *et al,* 2018). También ha resultado eficaz en un estudio reciente del CIETUS para el cribado diagnóstico de la esquistosomosis urogenital importada (Salas-Coronas *et al,* 2023).

## 2. Hipótesis y objetivos

El grupo de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS tiene amplia experiencia en el desarrollo y aplicación de métodos LAMP para el diagnóstico de diferentes enfermedades parasitarias, incluyendo un LAMP para la detección molecular de *S. haematobium* (*Sh*-LAMP). Sería de interés evaluar su funcionamiento en muestras de orina de individuos residentes en zona endémica y comparar el resultado con el obtenido con la microscopía como método de diagnóstico parasitológico de referencia de la esquistosomosis urogenital.

Objetivo general. Aplicar y valorar la tecnología LAMP para la detección de ADN de *S. haematobium* en muestras de orina de individuos residentes en zona endémica de esquistosomosis urogenital en el municipio de Cubal (Angola) y comparar los resultados con la microscopía.

### *Objetivos específicos*

1. Obtener ADN de muestras de orina recolectada de individuos residentes en zona endémica.
2. Aplicar y evaluar la técnica LAMP para la detección de *S. haematobium*.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. *Muestras y zona de estudio*

Se recolectaron un total de 192 muestras de orina y de heces de población atendida en el Hospital Nossa Senhora da Paz (Cubal, Angola) como parte de

un estudio colaborativo realizado por el CIETUS y el Hospital Vall d'Hebrón durante los meses de junio-agosto de 2022 para conocer la prevalencia de diferentes parasitosis en diferentes distritos poblacionales de Cubal.

### 3.2. *Obtención y análisis de las muestras*

La orina se recolectó para el análisis microscópico de huevos de *S. haematobium*. En el estudio de campo se determinaron las muestras de orina como parasitológicamente positivas o negativas en función de la presencia o ausencia, respectivamente, de huevos del parásito. Un volumen de 2 mL de cada muestra de orina se almacenó en congelación hasta su envío al CIETUS para su análisis con la técnica *Sh*-LAMP.

### 3.3. *Selección de muestras para el estudio mediante LAMP*

Para este estudio, se seleccionaron 33 muestras de orina atendiendo a su resultado parasitológico realizado en campo, incluyendo: 14 muestras parasitológicamente negativas (nos. 1-14) y 19 parasitológicamente positivas (nos. 15-33). Se utilizó orina de un voluntario sano y sin antecedente de viaje a zona endémica de esquistosomosis y se prepararon 5 viales como control negativo en el análisis (nos. 34-38). Como control positivo de amplificación mediante *Sh*-LAMP se utilizó ADN de *S. haematobium* (0,5 ng/µL), disponible en la genoteca del CIETUS.

### 3.4. *Extracción de ADN de las muestras de orina*

Se utilizó 1 mL de orina de cada una de las muestras para la extracción del ADN mediante el kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (NZYtech, Portugal), siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvieron 100 µL de eluído de ADN. Posteriormente, se utilizaron 2 µL de ADN de cada muestra como molde de amplificación en las distintas reacciones de *Sh*-LAMP.

### 3.5. *Análisis molecular mediante S. haematobium-LAMP*

Las 38 muestras de orina se analizaron mediante el método *Sh*-LAMP siguiendo el protocolo descrito previamente en Gandasegui *et al*; 2015. Los componentes de la mezcla de reacción (*master mix*) se indican en la Tabla 1. Las reacciones se incubaron durante 50 min a 65ºC en un termobloque, más 10 min adicionales a 80ºC para desactivar la enzima y parar la reacción. En todas las reacciones se incluyó ADN de *S. haematobium* (2 µL) como control positivo y agua ultrapura (2 µL) como control negativo. Las muestras se analizaron por duplicado.

Tabla 1. Mezcla de reacción (*master mix*) utilizada en la amplificación de *S. haematobium* mediante LAMP. La enzima *Bst* polimerasa 2.0 *Warm Start* (WS), buffer y $MgSO_4$ fueron suministrados por New England Biolabs; los *primers* F3/B3, FIP/BIP y LF/LB por Eurofins y los dNTPs por Intron.

| Componente | Volumen (µL/tubo) |
|---|---|
| H2O mQ | 5,62 |
| dNTPs (10 mM) | 2,1 |
| Isothermal buffer 10x | 1,5 |
| MgSO4 (100 mM) | 0,9 |
| F3/B3 (10 pmol/µL) | 0,3 |
| FIP/BIP (100 pmol/µL) | 0,24 |
| LF/LB (10 pmol/µL) | 0,6 |
| Bst polimerasa 2.0 WS | 0,6 |
| ADN muestra/ADN Sh/H2O | 2 |
| TOTAL | 15 |

### 3.6. *Detección de los productos de amplificación*

El revelado de las reacciones se realizó post-amplificación, añadiendo a los tubos 2 µL de una dilución 1:10 del agente intercalante de ADN SYBR® Green I (10,000X; Invitrogen). Las muestras que resultaron positivas cambiaron su color a verde, y las negativas mantuvieron el color naranja original del colorante.

## 4. Resultados

Los resultados obtenidos tras analizar las muestras de orina de los pacientes mediante *Sh*-LAMP se muestran en la Figura 2. Se obtuvo un resultado *Sh*-LAMP negativo (color naranja) en todas las muestras parasitológicamente negativas (nos. 1-14) y un resultado *Sh*-LAMP positivo de amplificación (color verde) en 17/19 (89,5%) muestras parasitológicamente positivas. Se obtuvo un resultado *Sh*-LAMP negativo (color naranja) en las muestras utilizadas control negativo del estudio.

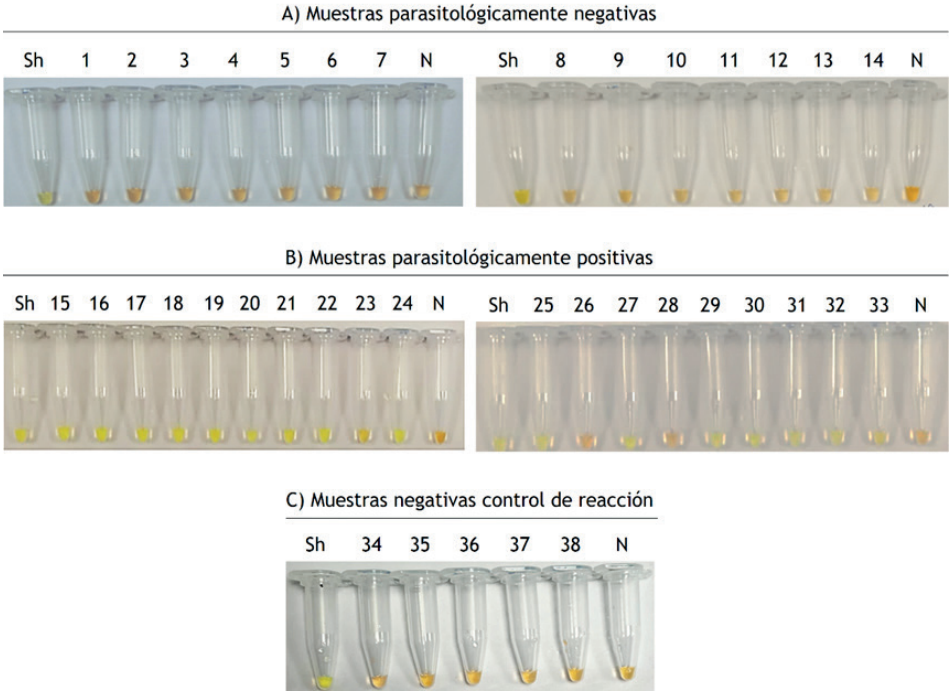



Figura 2. Análisis mediante *Sh*-LAMP de las muestras de orina incluidas en este estudio. A) Muestras parasitológicamente negativas (nos. 1-14); B) Muestras parasitológicamente positivas (números 15-33); C) Muestras negativas control de reacción (nos. 34-38). Sh, controles positivos de reacción (ADN de *Schistosoma haematobium*); N, controles negativos de reacción (agua ultrapura sustituyendo al ADN). Color verde, indica resultado positivo; color naranja, indica resultado negativo.

## 5. Discusión

El diagnóstico definitivo de la esquistosomosis urogenital es por la visualización microscópica de huevos de *S. haematobium* en orina mediante la técnica de sedimentación/centrifugación o por filtración con discos de policarbonato (recomendado por la OMS para el mapeo y control de la enfermedad en zonas endémicas) (WHO, 2023). Éste es un método ampliamente utilizado, barato, fácil de realizar y práctico en laboratorios de campo con limitada infraestructura y personal. Sin embargo, presenta baja sensibilidad, especialmente en infecciones con baja carga parasitaria y por la escasa y variable producción diaria de huevos;

además, no es útil en fase aguda, solo en fase crónica de la esquistosomosis, cuando hay producción de huevos (aproximadamente 2 meses tras la infección). La sensibilidad aumenta recogiendo un mayor número de muestras por individuo y en días consecutivos, pero esto complica el manejo en condiciones de campo. Son necesarias herramientas moleculares específicas y más sensibles que permitan la detección de ADN del parásito tanto en fase aguda como crónica de la enfermedad para evitar las complicaciones asociadas a las infecciones crónicas. La tecnología LAMP para la amplificación de ADN tiene una elevada especificidad y sensibilidad y permite la visualización colorimétrica de los resultados sin aparatos sofisticados, permitiendo su aplicación sencilla, fundamentalmente en áreas endémicas pobres de esquistosomosis.

Teniendo en cuenta la eficacia previa demostrada del *Sh*-LAMP en la detección de ADN de *S. haematobium* en muestras de orina de pacientes (Gandasegui *et al*, 2015; Gandasegui *et al*, 2018; Salas-Coronas *et al*, 2023) el resultado obtenido en el análisis de las muestras utilizadas en este estudio es muy aceptable, obteniéndose un resultado positivo de amplificación en un total de 17/19 (89,5%) muestras con confirmación parasitológica de infección por el parásito. Dos muestras parasitológicamente positivas por microscopía en campo (nos. 26 y 28) resultaron negativas por *Sh*-LAMP tal y como indica el color naranja obtenido en el revelado postamplificación. La ausencia de amplificación en estas dos muestras podría deberse a varios factores, como: *i)* una identificación microscópica errónea de los huevos en el estudio de campo, al identificar algún artefacto similar presente en la orina; *ii)* un escaso número de huevos en la orina, de forma que no estuvieran presentes en el volumen utilizado (1mL) en la extracción de ADN en el laboratorio; *iii)* posibles inhibidores en la orina (nucleasas, proteasas bacterianas, etc.) que dificultan la extracción de ácidos nucleicos y la amplificación (Fernández-Soto *et al*, 2013); *iv)* posible degradación del escaso ADN de *S. haematobium* presente en la orina tras un incorrecto mantenimiento de la cadena de frío en condiciones de campo (por múltiples ciclos de congelación/descongelación) y posterior transporte al laboratorio de referencia desde zona endémica (Gandasegui *et al*, 2015) y, por último, *v)* no habría que descartar algún posible error técnico al realizar el ensayo *Sh*-LAMP.

Por otra parte, el resultado negativo mediante *Sh*-LAMP de las muestras de orina parasitológicamente negativas (esto es, aquellas en las que no se determinó la presencia de huevos del parásito), así como las muestras de donante sano sin antecedente de infección posible con *S. haematobium* y, por tanto, también negativas, confirma la ausencia de falsos positivos y, por tanto, una correcta realización de la técnica *Sh*-LAMP.

## 6. Conclusión

La facilidad de uso, la sencillez de interpretación de los resultados, junto con el alto nivel de reproducibilidad de los resultados demostrado en un laboratorio de referencia respecto a la microscopía, sugieren que el ensayo *Sh*-LAMP diseñado para la detección específica de ADN de *S. haematobium* puede ser una prueba eficaz para el diagnóstico molecular de la esquistosomiasis urogenital en condiciones de campo en zonas remotas endémicas de la enfermedad. Su implementación podría ser muy útil en estudios epidemiológicos para el mapeo y posible control de la esquistosomosis urogenital.

## 7. Bibliografía

Beltran S, Galinier R, Alliene JF, Boissier J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(5): 501-503.

Chala B. Advances in Diagnosis of Schistosomiasis: Focus on Challenges and Future Approaches. Int J Gen Med. 2023;16: 983-995.

Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. Lancet. 2014; 383(9936): 2253-64.

Fernández-Soto P, Velasco Tirado V, Carranza Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, Muro A. Long-term frozen storage of urine samples: a trouble to get PCR results in *Schistosoma* spp. DNA detection? *PLoS ONE* 2013; 8(4): e61703.

Gandasegui J, Fernández-Soto P, Carranza-Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, Vicente B, López-Abán J *et al*. The Rapid-Heat LAMPellet Method: A Potential Diagnostic Method for Human Urogenital Schistosomiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(7): e0003963.

Gandasegui J, Fernández-Soto P, Dacal E, Rodríguez E, Saugar JM, Yepes E et al. Field and laboratory comparative evaluation of a LAMP assay for the diagnosis of urogenital schistosomiasis in Cubal, Central Angola. Trop Med Int Health. 2018;23(9):992-1001.

Hinz R, Schwarz NG, Hahn A, Frickmann H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. Mol Cell Probes. 2017; 31:2-21.

McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4(1): 13.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T., Watanabe K, Amino N *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28 (12): e63.

Salas-Coronas J, Luzón-García MP, Crego-Vicente B, Soriano-Pérez MJ, Febrer-Sendra B, Vázquez-Villegas J *et al*. Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) in Urine Samples for the Diagnosis of Imported Schistosomiasis. Trop Med Infect Dis. 2023;8(12):518.

Sánchez-Marqués R, Bocanegra C, Salvador F, Nindia A, Pintar Z, Martínez-Campreciós J *et al*. Prevalence and morbidity of urogenital schistosomiasis among pre-school age children in Cubal, Angola. PLoS Negl Trop Dis. 2023; 17(11): e0011751.

Sánchez-Marqués R, Salvador F, Bocanegra C, Nindia A, Pintar Z, Martínez J *et al*. *Schistosoma haematobium* infection and morbidity risk factors for pre-school age children in western Angola: A knowledge, attitudes and practices survey. PLoS Negl Trop Dis. 2023; 17(10): e0011650.

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc. 2008; 3(5): 877-882.

WHO. Fact Sheet Schistosomiasis [Internet]. WHO [actualizado 01 Feb 2023; citado 22 Ene 2024]. Disponible en: https://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/schistosomiasis.

Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. Diagnostics. 2023; 13 (9): 1530.

# Resúmenes de conferencia

ISSN electrónico: 2445-1355
DOI: https://doi.org/10.14201/fj2024926566

# METÍLICO, 60 AÑOS ENVENENADOS

## *Methyl: 60 Years Poisoned*

Fernando MÉNDEZ
Periodista y escritor
Correo-e: fernandomendez@gmx.es

*Palabras clave*: alcohol metílico; veneno; caso metílico; Fernando Méndez; investigación; periodismo.

Resumen de la conferencia

"Metílico, 60 años envenenados" es una conferencia de homenaje a los estudiantes y profesionales de Farmacia por la gran labor social que realizan.

Un envenenamiento masivo no deja de ser una pandemia. Al final, la consecuencia es la misma: enfermedad y sufrimiento.

Situémonos en el año 1963 en una pequeña botica de pueblo, en Lanzarote. La joven farmacéutica que está al frente tiene poca experiencia, pero un gran sentido de la responsabilidad y la valentía suficiente para hacer frente a la tragedia.

Así comienza el "caso Metílico", el mayor envenenamiento por bebidas elaboradas con metanol. Miles de víctimas y una sola copa de licor, la que bastaba para matar o dejar ciega a una persona en cuestión de horas.

Elisa Álvarez Obaya era aquella joven farmacéutica. Ella fue la heroína del metílico. Ella hizo posible que se descubriera el agente letal que estaba envenenando a la población en España y en países de Europa, África y América aquella primavera de 1963. En su modesta rebotica, con más voluntad que equipamiento, pudo descubrir que en muchas tiendas y bares de España se estaba vendiendo veneno embotellado. Un veneno que mataba lentamente y sin avisar. El metílico no tiene olor, color ni sabor, pero su letalidad es altísima, como se pudo constatar

en los ciegos y muertos que empezaron a caer a las pocas horas de ingerir las denominadas "bebidas asesinas".

Hoy, sesenta años después de aquella tragedia, el papel de aquella farmacéutica -que fue premiada por sus logros- sigue tan vigente como entonces. El ejemplo de Elisa Álvarez dignifica la profesión farmacéutica y a toda la sociedad. Dignidad y valentía. Dos palabras que definen vuestra profesión, la de mayor bienestar y cercanía con la sociedad. Si los alquimistas buscaban la piedra filosofal, vosotros ofrecéis al mundo el mayor tesoro que existe: BIENESTAR (con mayúsculas), una palabra que incluye: comprensión, afecto y soluciones para los males del cuerpo… y a veces también del espíritu. Así pues, me gustaría terminar la conferencia con un homenaje a la heroína del Metílico, a Elisa Álvarez Obaya, y también a vosotros. Porque todos tenéis en común la palabra VALENTÍA, porque trabajar para hacer el bien a los demás requiere de una alta dosis de compromiso social, y para ello hay que tener una gran determinación: ser muy valiente.

## CV Fernando Méndez

Fernando Méndez (Fernando Rodríguez Méndez) es un periodista y escritor ourensano. Es autor de las investigaciones sobre el "caso Metílico", sobre el que ha escrito tres libros y ha recibido premios nacionales e internacionales.

Es miembro de la Federación de Asociaciones de Periodistas de España y de la Federación Internacional de Periodistas. Autor de ocho libros, articulista y colaborador literario, trabajó como jefe de prensa en diferentes instituciones de Galicia, fue director de entidades culturales y redactor en los diarios La Región y Faro de Vigo, además de colaborador en ABC, Televisión de Galicia, Cuatro TV y Radio Nacional.

Fernando Méndez.– fernandomendez@gmx.es – www.fernandomendez.es

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: Cristina Alcalde Eón, Jesús José Aldegunde Carrión, Adrián Bogeat Barroso, Beatriz Cartujo Redondo, Beatriz Castaño Rodríguez, Álvaro Gacho Temprano, Ana María González Paramás, Ángela Patricia Hernández García, Narciso Martín Quijada, Luz María Muñoz Centeno, Francisco Javier Pérez Bueno, Javier Sánchez Martín, Carmen Tejedor Gil, Lucía Velasco Roces y Victoria Joaquina Villasán García.

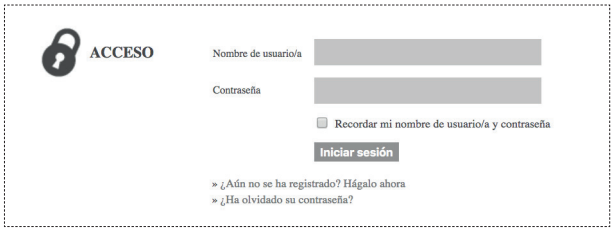
# NORMAS DE PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

## ENVÍOS EN LÍNEA A TRAVÉS DE eUSAL 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 registrase:
[insertar enlace a https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/user/register]




## 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.

farmajournal

e-ISSN: 2445-1355 — http://dx.doi.org/10.14201/fj202492

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2024, vol. 9, n. 2

# ÍNDICE

## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Jimena Barbero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús, *Liposomas de ergosterol en formulaciones liofilizadas de administración bucal* ..... 7-17

Julia Fernández Cencerrado; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto, *Aplicación de la tecnología lamp en el diagnóstico molecular de infecciones por Strongyloides stercoralis* ..... 19-29

Natalia García Plata; Paulo Teixeira da Silva; Ana Martín Suarez *Servicio de atención farmacéutica a personas mayores* ..... 31-39

Javier González; Javier Tascón; Alfredo G. Casanova; Laura Vicente-Vicente; Ana I. Morales; Marta Prieto, *Predicción del daño renal asociado a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes oncológicos* ..... 41-50

Daniel Mateos Carril; Beatriz Crego-Vicente; Manuel Diego del Olmo; Pedro Fernández-Soto, *Aplicación de la tecnología lamp (*loop-mediated isothermal amplification*) para el diagnóstico molecular de infecciones por Schistosoma haematobium* ..... 51-61

## RESÚMENES DE CONFERENCIAS

Fernando Méndez, *Metílico, 60 años envenenados* ..... 65-66

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Fecha de publicación de este volumen: diciembre de 2024