



ACCESO  ABIERTO

Evaluación toxicológica de una formulación de Adalimumab usando *Caenorhabditis Elegans* como modelo biológico

Toxicological evaluation of an Adalimumab formulation using Caenorhabditis Elegans as a biological model

Julia Gonzalez Puerta¹, Maria Cecilia García Espiñeira², & Elin Yohana Manrique Julio³

¹ Facultad de Farmacia, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

² Maestría en Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

³ FATOXACOL, Barranquilla, Colombia.

RESUMEN

Introducción: los inhibidores del Factor de Necrosis Tumoral o anti-TNF son medicamentos biológicos utilizados en el tratamiento de procesos inflamatorios crónicos. El adalimumab es un representante de este grupo de fármacos usados en psoriasis en placas, artritis psoriásica reumatoide, etc. Sus antecedentes en reportes del programa farmacovigilancia sobre las reacciones adversas direccionaron el desarrollo de este bioensayo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (C. elegans).

Objetivo: evaluar la toxicidad de Adalimumab en el modelo biológico C. elegans.

Métodos: se realizó un bioensayo en el nemátodo *C. elegans* empleando la cepa silvestre N2 y las cepas transgénicas SDO-4, HSP-3, GPX-4 que fueron expuesta a diferentes concentraciones de adalimumab para evaluar su toxicidad.

Resultados: las diferentes concentraciones de Adalimumab no alteraron su ciclo de vida del C. elegans, pero si produjeron neurotoxicidad demostrada por sobreexcitación de la locomoción, así como disrupción endocrina además de daño tisular.

Conclusión: es necesario contar con más estudios sobre toxicidad para los medicamentos biológicos y contar con programas de Farmacovigilancia, para la notificación de sospecha de toxicidad por estos fármacos.

Palabras Clave: Adalimumab; toxicidad; C. elegans; bioensayo.

ABSTRACT

Introduction: Tumor Necrosis Factor or anti-TNF inhibitors are biological drugs used in the treatment of chronic inflammatory processes. Adalimumab is a representative of this group of drugs used in plaque psoriasis, rheumatoid

Para citaciones: González Puerta, J., García Espiñeira, M., & Manrique Julio, E. (2022). Evaluación toxicológica de una formulación de Adalimumab usando *Caenorhabditis Elegans* como modelo biológico. *Revista Ciencias Biomédicas*, 11(3), 202-210.
<https://doi.org/10.32997/rcb-2022-4060>

Recibido: 17 de mayo de 2022

Aprobado: 10 de julio de 2022

Autor de correspondencia:

Julia González Puertas

juliagonzalez@mail.uniatlantico.edu.co

Editor: Inés Benedetti. Universidad de Cartagena-Colombia.

Copyright: © 2022. González Puerta, J., García Espiñeira, M., & Manrique Julio, E. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> la cual permite el uso sin restricciones, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre y cuando el original, el autor y la fuente sean acreditados.



psoriatic arthritis, etc. His background in pharmacovigilance program reports on adverse reactions directed the development of this bioassay in the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Objective: To evaluate the toxicity of Adalimumab in the biological model *C. elegans*.

Methods: a bioassay was carried out on the nematode *C. elegans* using the wild strain N2 and the transgenic strains SDO-4, HSP-3, GPX-4 that were exposed to different concentrations of adalimumab to evaluate their toxicity.

Results: the different concentrations of Adalimumab did not alter the life cycle of *C. elegans*, but they did produce neurotoxicity demonstrated by overexcitation of locomotion, as well as endocrine disruption in addition to tissue damage.

Conclusions: it is necessary to have more studies on toxicity for biological drugs and to have Pharmacovigilance programs, for the notification of suspected toxicity by these drugs.

Keywords: Adalimumab, toxicity, *C. elegans*, bioassay.

INTRODUCCIÓN

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) es una citoquina proinflamatoria con un papel clave en la patogénesis de enfermedades inflamatorias o autoinmunes como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la espondilitis anquilosante o la psoriasis. Interviene en muchos procesos fisiológicos importantes como la apoptosis, la activación celular y la inducción de otras citoquinas inflamatorias (1). Los medicamentos inhibidores del TNF ofrecen una estrategia específicamente dirigida, que contrasta con los inmunosupresores no específicos que tradicionalmente se emplean en la mayoría de estas enfermedades.

Uno de los medicamentos para tratar la psoriasis y las enfermedades reumatológicas es el Adalimumab (2); el cual es un anticuerpo monoclonal recombinante IgG1 humano que se une con elevada afinidad al TNF α (3). Los estudios clínicos convencionales han reportado que no muestra riesgos especiales para los seres humano en cuanto a toxicidad a dosis única, a dosis

repetidas y de genotoxicidad (4) y la experiencia con adalimumab sólo aporta información con respecto a su seguridad a medio plazo, por lo que deberán pasar unos años para poder confirmar estos resultados a largo plazo. Por lo anterior es imprescindible realizar un cribaje correcto de los pacientes candidatos al fármaco y monitorizarlos estrechamente durante el período de tratamiento y hasta 5 meses después (5).

En la actualidad el creciente interés por el desarrollo y empleo de pruebas biológicas para evaluar los efectos tóxicos potenciales de algunos medicamentos sobre los seres humanos y los ecosistemas han permitido bioensayos que evidencian daños genéticos y tóxicos (6). Puesto que los ensayos en animales como ratones y conejos son costosos y demorados, se desarrollan modelos biológicos en organismos más sencillos. Estos se pueden elaborar mucho más rápidos y económicos y así evitar los problemas de manejo de animales en el laboratorio (7). Por lo cual el presente estudio empleó un modelo biológico como el *C. elegans*.

MÉTODOS

El estudio se enfocó en la evaluación toxicológica de un medicamento biotecnológico Adalimumab, utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, usando el modelo biológico *C. elegans*. La técnica empleada, para este bioensayo fue la exposición del nemátodo a diferentes concentraciones del medicamento para observar los cambios que se presentaban con relación a su crecimiento, locomoción, muerte y lo relacionado con el estrés oxidativo. El estudio de la evaluación toxicológica del medicamento Adalimumab se llevó a cabo en las instalaciones de los laboratorios del grupo Biotoxam en la Universidad de Cartagena, las cepas de *C. elegans* fueron donadas por el grupo Biotoxam de la Universidad de Cartagena, Colombia.

Tipo de estudio

Se realizó un bioensayo en el que se utilizó la cepa silvestre N2 y las cepas transgénicas SDO-4, HSP-3 y GPX-4. de *C. elegans* que fueron expuestas a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 μM de adalimumab para evaluar su toxicidad. Se establecieron y evaluaron los siguientes parámetros: alteraciones del crecimiento, locomoción, mortalidad y estrés oxidativo posterior a la exposición a Adalimumab en *C. elegans*.

Las cepas de *C. elegans* fueron colocadas y mantenidas en platos Petri en agar K, preparado con KCl, NaCl, agar, peptona, colesterol, nistatina, CaCl_2 y MgSO_4 . Los medios fueron inoculados con *E. coli* OP50 y se mantuvieron a 20 °C. Para sincronizar los nemátodos estos fueron tratados por diez minutos con solución blanqueadora con NaClO y NaOH, para oxidar cualquier otro organismo presente, quedando solamente los huevos de *C. elegans*. Aproximadamente 14 h después los huevos eclosionaron, de manera que todas las larvas se encontraron en estado L1 para permitir su crecimiento hasta el estadio L4 y proceder a evaluar los parámetros mencionados.

Mortalidad

Los nemátodos fueron cultivados en placas de agar K y fueron lavados usando medio K. se colocaron 10 ± 1 gusanos N2 sincronizados en edad larval L4 por pozo en placas de 96 pozos junto con las concentraciones del Adalimumab y una dilución al 50 % en agua ultrafiltrada. Se realizaron cuatro réplicas por cada tratamiento y se utilizó agua ultrafiltrada como control. Las placas fueron incubadas a 20 °C, y se contó el número de organismos muertos y vivos a las 24 horas usando un microscopio de disección (8).

Locomoción

Se utilizaron aproximadamente 30 gusanos por tratamiento. A las 24 h de la exposición a la formulación del Adalimumab en disolución y a la dilución al 50 %, se contó el número de curvamientos del cuerpo de cada nemátodo en un período de 20 segundos. Ese curvamiento se observó como un cambio en la dirección de la vulva superior de la faringe a lo largo del eje Y, suponiendo que los nemátodos se desplazan a lo largo del eje X (8).

Cambios en la expresión de genes de respuesta al estrés

La expresión de los genes fue monitoreada utilizando el GFP para *C. elegans*. Se usó las cepas transgénicas hsp-3, sod-4 y gpx-4. Se utilizaron aproximadamente 15 gusanos en todas las etapas larvianas los cuales fueron colocados en microplacas negras de 96 pozos con la solución de adalimumab. fueron incubadas a una temperatura de 15 °C y 24 h después se registró la fluorescencia por medio del fluoroscán Perkin-Elmer Victor 1420. Se comparó con la solución control.

Crecimiento

Se expusieron aproximadamente 500 larvas de la cepa silvestre Bristol N2 en edad larval a la formulación del Adalimumab en disolución. En placas de cultivo celular de 96 pozos fue determinada la longitud de los nemátodos 48 h

después de la exposición empleando un microscopio de disección Nikon smz 745T con un aumento de 100X y el software Image J.

Ensayos con reporteros empleando la proteína verde fluorescente (GFP)

Los nematodos se cultivaron en placas de agar NGM y se lavaron usando medio K enfriado con hielo (53 mM NaCl, 32 mM KCl). Se colocaron alícuotas iguales (10 μ L) de gusanos en todas las etapas de cada cepa reportera en microplacas negras de 96 pozos, no fluorescentes de fondo en U junto con a la formulación del Adalimumab. Para mantener igual concentración de gusanos se empleó un agitador magnético para mantener una mezcla homogénea de nemátodos. Las placas fueron incubadas a 20 °C, y la determinación de la fluorescencia se realizó a las 4 y 24 h. Después de reposar en hielo durante 15 min, la fluorescencia se cuantificó mediante el uso de un lector de placas Perkin-Elmer Victor 1420, usando filtros de paso de banda a 485 y 525 nm para la excitación y la emisión, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las diferencias significativas se determinaron con ANOVA, usando la prueba de Dunnett como post-test, para comparar cada

muestra con el control. Se estableció como criterio de significancia estadística $P < 0.05$. La toxicidad en *C. elegans* fue evaluada a través del estudio de parámetros relacionados con la fisiología del nemátodo, incluyendo variables tales como mortalidad, locomoción y crecimiento. De igual forma, fueron valoradas las alteraciones en la expresión de genes de respuesta al estrés en cepas transgénicas del nemátodo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad

Los ensayos de mortalidad no mostraron cambios con las diferentes concentraciones de Adalimumab a las que se expuso al nemátodo. La mayor mortalidad se presentó en el medio de la solución de 10 μ M (12 \pm 1%), entre 10 μ M y 100 μ M no hubo diferencia significativa. Las diferentes concentraciones de la muestra experimental no evidenciaron efecto negativo sobre la supervivencia de este nemátodo; la mortalidad fue alrededor del 1% con la concentración de 10 μ M siendo este un porcentaje bastante bajo para las concentraciones totales. Se realizó también una dilución de la muestra de la formulación de Adalimumab al 50% con la cual no se presentó mortalidad, (Figura 1).

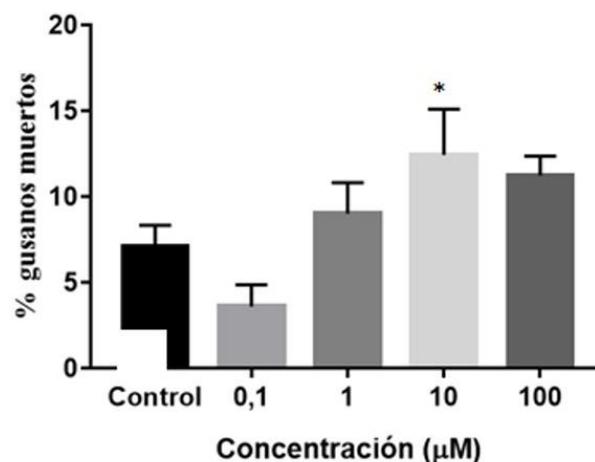


Figura 1 Efecto de las soluciones del Adalimumab a diferentes concentraciones sobre la mortalidad en la cepa silvestre Bristol N2 durante 24 h. Los datos se presentan como porcentaje de los gusanos de 10 ± 1 expuestos a partir de 4 ensayos independientes

Crecimiento

Se observó que la muestra de nematodos expuesta al control tuvo en promedio una longitud de 380 μm , mientras que la longitud de los nematodos expuestos a la formulación con el Adalimumab aumentó considerablemente incluso hasta valores superiores a los 500 μm , validado por la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P <$

0.0011) entre las concentraciones de la muestra y el control.

La curva de crecimiento tuvo una forma de "U" con la mayor inhibición a 0.1 μM , pero con un incremento a partir de 1.0 μM . Los promedios de la longitud del cuerpo expresada en μM son presentados en la Figura 2.

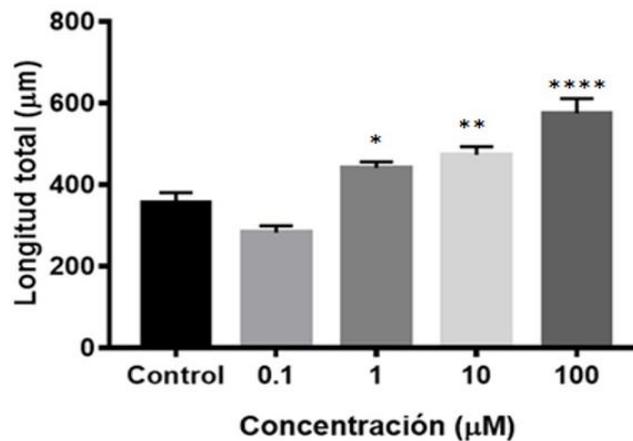


Figura 2 Crecimiento de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a soluciones del Adalimumab a diferentes concentraciones. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$) *, ($p < 0.004$) **, ($p < 0.0001$) ****. Diferencia significativa entre 1 μM y 100 μM ($p < 0.05$). (ANOVA de una vía), múltiple comparación.

Locomoción

Se observó un aumento en el movimiento del nemátodo con respecto al control, excepto en la solución de concentración 1 μM . Existe una sobre

excitación no dependiente de la dosis. Los resultados de locomoción, expresados como número de curvamientos del cuerpo en 20 segundos, son presentados en la Figura 3.

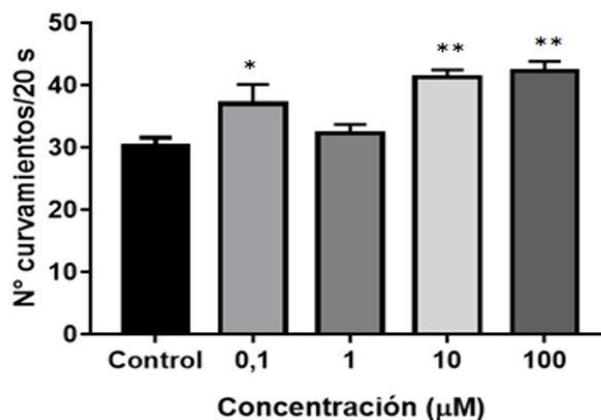


Figura 3 Locomoción de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a soluciones del Adalimumab a diferentes concentraciones. Diferencias significativas con el control ($p < 0.07$) *, ($p < 0.003$) **, ($p < 0.0023$) **. Diferencia significativa entre 0.1 μM , 10 μM y 100 μM ($p < 0.05$). (ANOVA de una vía), múltiple comparación.

Cambios en la expresión de genes de respuesta al estrés

La formulación del Adalimumab fue capaz de elevar significativamente las actividades de las 3 enzimas estudiadas. La enzima con mayor expresión fue la SOD-4 a las concentraciones de 0.1 μ M, 10 μ M y 100 μ M, donde se registró la mayor fluorescencia relativa de la cepa de *C. elegans*, modificada para la expresión de este gen,

alcanzando casi 5 veces el nivel de expresión del ensayo control. La actividad del hsp-3 se aumentó, debido al estrés general, lo cual indica que su actividad está relacionada en arreglar las proteínas dañadas por el incremento en la expresión la cual fue dependiente de la dosis hasta 10 μ M. Esto sugiere un efecto de envejecimiento celular por liberación de radicales libres lo que lleva a efectos subletales, (Figura 4).

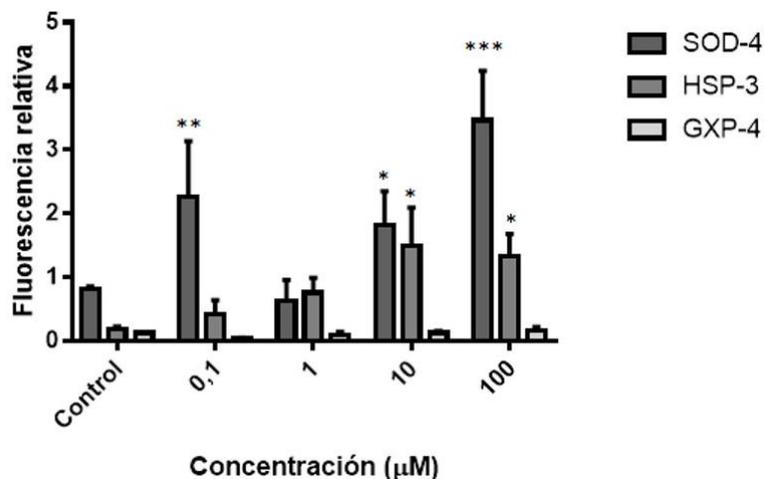


Figura 4. Las cepas transgénicas expuesta a las diferentes concentraciones de la solución del Adalimumab. Se puede observar en la gráfica gxp-4 no se sobre expresa; la sod-4 súper oxidasa dismutasa se sobre expresa debido al estrés oxidativo con diferencias significativas con el control y las otras cepas ($p < 0.03$); la cepa hsp-3 debido al estrés general se sobre expresa hasta la concentración 10 μ M.

DISCUSION

Adalimumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano, IgG₁, producido por tecnología de ADN recombinante, con una elevada afinidad y especificidad al factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el cual es usado actualmente como terapia biología para el tratamiento de patologías como, artritis reumatoidea, idiopática, psoriásica, enfermedad de Crohn entre otras patologías (5,9,10). En su ficha de seguridad se reportan algunas reacciones adversas entre las cuales figuran: múltiples infecciones (p. ej., de las vías respiratorias superiores, sinusitis), reacciones en el lugar de inyección, dolor de cabeza y erupciones, pero se ofrecen múltiples advertencias y precauciones previo a su uso y destaca la

incidencia de neoplasias malignas que fue mayor en pacientes tratados con el medicamento en comparación con el control, al igual que la aparición o exacerbación de enfermedad desmielinizante, citopenias, pancitopenias, insuficiencia cardíaca y nefrotoxicidad, entre otras (9).

En este bioensayo, teniendo en cuenta que no fue posible evidenciar estudios preclínicos en modelos biológicos *in vivo* que reporten casos de medición de parámetros toxicológicos con el Adalimumab, se pudo establecer que, a pesar de las diferentes concentraciones del medicamento a las que fue sometido el nematodo, no se encontraron diferencias significativas, pero según los estudios realizados por Piper Hunt et al, se ha demostrado

que la clasificación de toxicidad en *C. elegans* es tan predictiva como la LD₅₀ en rata o la LD₅₀ de ratón y esta correlación hace útil al modelo para testeos tempranos de seguridad y como estrategia de pruebas de toxicidad integradas o escalonadas, aunque aun así, nunca podrá reemplazar los datos obtenidos con mamíferos para la evaluación de fármacos u otros compuestos (11).

Con respecto al patrón de crecimiento del *C. elegans* expuesto a concentraciones del medicamento, se evidencia de manera significativa el efecto de la formulación en la longitud del nematodo. De manera que, a mayor concentración mayor fue la longitud promedio de los gusanos, ésta última observación demuestra que el efecto de la formulación con el Adalimumab en el desarrollo del cuerpo de los nematodos es dependiente de la concentración y que a mayor concentración mayor aumento de tamaño del nematodo, lo cual sugiere efecto de disrupción endocrina. En la literatura se encuentran reportados algunos efectos de disrupción endocrina sobre el *C. elegans*, entre ellos, el efecto de la genisteína (12), y en el caso del Adalimumab se han reportado efectos endocrinos como, trastornos paratiroideos y bocio (2,13). Con respecto al parámetro locomoción, es evidente la sobreexcitación no dependiente de la dosis, y el Adalimumab en su ficha técnica reporta reacciones adversas asociadas al sistema nervioso central, el resultado del bioensayo podría estar asociado a esta alteración neurotóxica en el nematodo (14).

Finalmente, en la expresión de genes de respuesta al estrés, el bioensayo mostró que los nematodos expuestos presentaron sobreexpresión de las proteínas Sod-4, Gpx-4 y Hsp-3, evidenciando mejora de la resistencia contra el estrés oxidativo. El resultado de los cambios en la expresión génica del bioensayo tiene un aporte importante en la identificación de la formación de radicales libres causado por Adalimumab. Se debe resaltar que una de las causas de nefrotoxicidad es la producción de radicales libres inducida por fármacos y este

medicamento biotecnológico está entre los grupos farmacológicos implicados en el desarrollo de nefrotoxicidad (15,16)

Como datos de interés es necesario resaltar que dentro del desarrollo del bioensayo se presentaron dificultades que se consideran importantes para futuros estudios con este o con otros medicamentos biotecnológicos; los cuales son enunciados a continuación:

- a. Dificultad en la preparación diluciones para obtener concentraciones requeridas debido a que no se encontró información en bases de datos que permitieran un patrón de referencia.
- b. No se encontró ensayos preclínicos realizados con Adalimumab.
- c. Los estudios existentes fueron realizados en cohortes de pacientes con enfermedades como psoriasis, enfermedad de Crohn, artritis, citometría de flujo, pero, con modelos biológicos conocidos al momento del realizar este estudio no se encontraron datos relevantes en las bases de datos consultadas.

Se espera que se siga estudiando en modelos más complejos los efectos del medicamento y que este bioensayo sirva de base a investigaciones toxicológicas futuras.

CONCLUSIONES

Las diferentes concentraciones de Adalimumab, no evidenciaron efecto negativo sobre la supervivencia de este nemátodo en la evaluación de la mortalidad, no altera el ciclo de vida ni la longevidad.

La sobreexcitación de la locomoción del gusano expuesto a las diferentes concentraciones de la formulación de Adalimumab demuestra la neurotoxicidad causada por este agente externo.

El Adalimumab es un disruptor endocrino, que produce un incremento en la longitud del nematodo, demostrando un nivel de toxicidad.

El incremento de la actividad de las cepas transgénicas SDO-4 y HSP-3 expuestas en la formulación de Adalimumab, es producto de la liberación de radicales libres, los cuales son eliminados por estas enzimas, dicha reacción implica REDOX del cofactor del metal del sitio activo de la enzima. Esto indica la inducción al envejecimiento y daño celular por la solución en estudio.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES: concepción y diseño del estudio: JGP, MCG; recolección análisis e interpretación de datos: JGP, MCG; redacción del borrador del artículo, revisión crítica y aprobación de versión final responsable de la veracidad e integridad del artículo: EMJ, JGP.

CONFLICTOS DE INTERESES: los autores declaran no tener conflictos de interés.

FINANCIACIÓN: la presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

REFERENCIAS

- Lara ST, Lara ST. Alteraciones En El Sistema Urinario Por Adalimumab Y Golimumab Reportados Al Programa Distrital De Farmacovigilancia En Bogota durante el periodo comprendido entre el 2012 al 2016 Luis Alberto Mendoza Londoño Saraí Triviño Lara. UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES - U.D.C.A; 2013.
- Alimentos A de, UU. y M de los E. HUMIRA® (adalimumab) - Spanish NW [Internet]. Chicago; 2002. Report No.: 64C-1913328 NW. Available from: https://www.rxabbvie.com/pdf/humira_SPA.pdf
- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):35–45.
- Pivot X, Romieu G, Bonnefoi H, Pierga J-Y, Kerbrat P, Guastalla J-P, et al. Abstract S5-3: PHARE Trial results of subset analysis comparing 6 to 12 months of trastuzumab in adjuvant early breast cancer. *Cancer Res.* 2012;72(24 Supplement):S5-3-S5-3.
- Ferran M, Pujol RM. Seguridad de adalimumab TT - Safety of adalimumab. *Actas Dermosifiliogr.* 2008;99(supl.3):15–24.
- Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Rev CENIC Ciencias Biol.* 2007;38(3):204–8.
- Imanikia S, Galea F, Nagy E, Phillips DH, Stürzenbaum SR, Arlt VM. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;45:356–61.
- Lesly Patricia Tejeda Benítez Jesús Tadeo Olivero Verbel. Perfil toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena usando como modelo biológico *Caenorhabditis elegans*. La Rábida: Universidad de La Rábida; 2016.
- Agencia Europea de Medicamentos. Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto 1 [Internet]. Agencia Europea de Medicamentos. 2020. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kyntheum-epar-product-information_es.pdf
- Wcisło-Dziadecka D, Simka K, Kaźmierczak A, Kruszniewska-Rajs C, Gola J, Grabarek B, et al. Psoriasis Treatment Changes the Expression Profile of Selected Caspases and their Regulatory MicroRNAs. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(2):538–51.
- Hunt PR, Olejnik N, Bailey KD, Vaught CA, Sprando RL. *C. elegans* Development and Activity Test detects mammalian developmental neurotoxins. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018;121(September):583–92. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.061>

12. Palacio, Villalba B. Efecto de disrupción endocrina de la genisteína sobre *Caenorhabditis Elegans*. *Investig Andin*. 2020;22(41):1–21.
13. Ordoñez NJ, Sánchez Castillo J. Alteraciones endocrinas asociadas al uso medicamentos en el Programa Distrital de Farmacovigilancia de Bogotá durante el periodo 2012 a 2016. *Rev Salud Bosque*. 2019;9(1).
14. Destacada I, La S, Malignas N. 64C-1913328 NW - Spanish - Humira® (adalimumab). 2002;
15. Vide J, Magina S. Moderate to severe psoriasis treatment challenges through the era of biological drugs. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5):668–74.
16. Iguacel CG, Prestel VS, Cascante AB, Santonja C, Egido J. caso clínico de lclub de nefropatología Fracaso renal agudo en paciente tratado con antifactor de necrosis tumoral-alfa. 2011;484–8.