

Efetividade e toxicidade da cloroquina e da hidroxicloroquina associada (ou não) à azitromicina para tratamento da COVID-19. O que sabemos até o momento?

Effectiveness and toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine associated (or not) with azithromycin for the treatment of COVID-19. What do we know so far?

Carolline Rodrigues Menezes¹ , Cristina Sanches² , Farah Maria Drumond Chequer² 

1. Discente do curso de Medicina pela Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu (UFSJ-CCO), Divinópolis, MG, Brasil. 2. Docente do curso de Farmácia da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu (UFSJ-CCO), Divinópolis, MG, Brasil.

Resumo

Objetivos: identificar as evidências científicas existentes até o presente momento sobre a efetividade do uso da cloroquina, da hidroxicloroquina associada (ou não) à azitromicina para tratamento da afecção pelo coronavírus e seus possíveis efeitos adversos e tóxicos aos seres humanos. **Métodos:** a revisão narrativa utilizou-se das bases de dados PubMed, LILACS, SciELO e Google Acadêmico. Nessas, buscaram-se estudos, utilizando-se dos descritores “covid”, “coronavírus”, “SARS-CoV-2”, “chloroquine”, “hydroxychloroquine”, “azithromycin” e “adverse effects” junto com os operadores booleanos “AND” e “OR”. **Resultados:** sete artigos, das trinta publicações encontradas, atenderam aos critérios de inclusão, sendo utilizados para compor a presente revisão. Dos sete ensaios clínicos analisados, cinco apresentaram resultados de cura e/ou remissão dos sintomas e/ou redução da carga viral dos pacientes, no entanto apresentaram muitas limitações. **Conclusão:** a literatura científica é escassa e divergente quanto à efetividade dos medicamentos cloroquina e hidroxicloroquina associada (ou não) à azitromicina no tratamento da COVID-19, pela rápida disseminação e instalação da pandemia na esfera global. É necessário a realização de ensaios clínicos pragmáticos, envolvendo um número maior de pacientes, para que seja possível analisar a efetividade no combate ao coronavírus, bem como a segurança do uso desses fármacos.

Palavras-chave: Cloroquina. Hidroxicloroquina. Azitromicina. Efeitos Adversos. Toxicidade.

Abstract

Objective: to identify the scientific evidence existing to date on the effectiveness of the use of chloroquine, hydroxychloroquine associated (or not) to azithromycin for the treatment of COVID-19 disease and its possible adverse drug events and toxicity to human health. **Methods:** the narrative review was performed using the PubMed, LILACS, SciELO and Google Academic databases. In these, studies were sought, using the descriptors “covid”, “coronavirus”, “SARS-CoV-2”, “chloroquine”, “hydroxychloroquine”, “azithromycin”, “adverse effects” and “toxicity”, together with the Boolean operator “AND” and “OR”. **Results:** seven studies of thirty publications met the inclusion criteria and were used in the present review. Of the seven clinical trials analyzed, five showed results of cure and/or remission of symptoms and/or reduction of patients’ viral load, however these studies had many limitations. **Conclusion:** scientific literature is scarce and divergent as to the effectiveness of the drugs chloroquine and hydroxychloroquine associated (or not) with azithromycin in the treatment of COVID-19, due to the rapid spread and installation of the pandemic in the global sphere. It is necessary to carry out pragmatic clinical trials, involving a larger number of patients, so that it is possible to analyze the effectiveness in combating the coronavirus, as well as the safety of the use of these drugs.

Keywords: Chloroquine. Hydroxychloroquine. Azithromycin. Adverse Drug Event. Toxicity.

INTRODUÇÃO

A pandemia de Coronavírus (COVID-19) é um quadro de grave crise global de saúde e representa uma situação de grandes incertezas pelo desconhecimento acerca do vírus e sobre o manejo dos pacientes que vem crescendo exponencialmente. O vírus pertence à família Coronaviridae, responsável por causar doenças, majoritariamente, em mamíferos e aves. Em humanos, é responsável por infecções do trato respiratório que geram quadros leves ou variantes graves, tais quais outros vírus da mesma família, como a síndrome aguda respiratória severa

(SARS) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS). O nome Corona vem da aparência característica de coroa ao redor dos vírions na visão da microscopia eletrônica por ter uma superfície coberta por proteínas espiculadas^{1,2}.

A síndrome aguda respiratória severa do Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) foi primeiro identificada em Wuhan, China, em dezembro de 2019, e a Organização Mundial da Saúde a reconheceu como pandemia em 11 de março de 2020. Até a data de 13 de abril,

Correspondente: Farah Maria Drumond Chequer. Laboratório de Análises Toxicológicas. Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) - Campus Centro-Oeste Dona Lindu (CCO). R. Sebastião Gonçalves Coelho 400, Chanadour. 35.501-296 Divinópolis, MG Brasil. E-mail: farahchequer@ufs.edu.br
Recebido em: 5 Abr 2020; Revisado em: 10 Abr 2020; Aceito em: 14 Abr 2020

2 Cloroquina e hidroxiclороquina para tratamento da COVID-19: uma revisão

mais de 1.739.007 casos de COVID-19 foram identificados em 213 países e resultando em mais de 108.432 mortes³.

A transmissão ocorre por gotículas respiratórias seja por pessoas que transmitem seja por superfícies contaminadas. O contágio pode acontecer em ambos os pacientes com cortejo ou mesmo assintomáticos, e o tempo de incubação varia de 2-14 dias². Sintomas iniciais podem variar de tosse, febre, fadiga, dispnéia, e as complicações incluem pneumonia e síndrome da angústia respiratória aguda. O diagnóstico é feito com avaliação clínica do paciente, podendo ser utilizados, de forma complementar, exames como Tomografia Computadorizada em conjunto com a identificação do vírus por meio do método de reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR). Ademais, é possível a realização do teste rápido, em que são detectados imunoglobulinas IgM e IgG, com resultado em cerca de 15 minutos. Não existe tratamento antiviral específico. Medidas para prevenção na saúde da população incluem higiene das mãos e distanciamento social para evitar disseminação em massa do vírus⁴⁻⁶. O estudo de Walker e colaboradores⁷ estima que estratégias de saúde pública supracitadas podem prevenir cerca de 0,2 mortes a cada 100.000 habitantes e, caso sustentada, salve cerca de 38,7 milhões de vidas. O atraso na implementação pode piorar prognósticos e diminuir o número de vidas poupadas.

Têm sido levantadas hipóteses de diversos medicamentos, incluindo a cloroquina (um fármaco utilizado no tratamento da malária e afecções reumatológicas) e percebeu-se um efeito inibidor do SARS-CoV-2 in vitro⁸. Um análogo da cloroquina, a hidroxiclороquina, apresentou atividade in vitro anti-SARS-CoV, especialmente em associação ao fármaco azitromicina⁸.

O Ministério da Saúde publicou, em 27 de março, uma nota informativa, justificando o uso de cloroquina como terapia adjuvante no tratamento de formas graves do COVID-19⁹. A Anvisa também realizou divulgação pública em 27 de março acerca da liberação de pesquisas com uso de hidroxiclороquina e azitromicina para prevenção de complicações em pacientes com infecção pelo novo coronavírus (Covid-19) com casos leves e moderados, e para avaliação da segurança e eficácia clínica desses fármacos em pacientes com pneumonia causada por infecção pelo vírus Sars-CoV-2 (pacientes graves)¹⁰.

Acrescido a isso, a divulgação, por intermédio das mídias sobre o possível uso da hidroxiclороquina no combate do COVID-19, despertou uso desenfreado e automedicação pela população geral incitada pelo medo da pandemia e desencadeou, em 21 de março, em notícia reportada pela *Cable News Network* (CNN), uma morte nos Estados Unidos por uso indiscriminado do medicamento¹¹.

O consumo indevido de medicamentos representa um grande problema de saúde pública. Embora seja comercializado sob prescrição médica, com rigoroso controle, sabe-se que o uso dessas substâncias, muitas vezes, ocorre sem nenhuma orientação profissional, sendo adquiridos, de maneira ilícita,

no mercado negro^{12,13}. A falta do fármaco para pacientes portadores de doenças em que a cloroquina e hidroxiclороquina estão formalmente indicadas, como lúpus eritematoso e artrite reumatoide, já é uma realidade. O temor e a desinformação são grandes motivadores para uso indiscriminado desse medicamento¹⁴.

Abaixo serão apresentadas as características farmacológicas, terapêuticas e toxicológicas desses medicamentos.

Cloroquina

A cloroquina e hidroxiclороquina são fármacos utilizados no tratamento de malária e de artrite reumatoide e são considerados imunomoduladores e não imunossupressores. A cloroquina tem sido, cada vez menos, utilizada por ser mais susceptível à toxicidade, especialmente seu efeito ototóxico e efeitos colaterais como hiperpigmentação cutânea e retinopatia não são incomuns. O protocolo de seu uso envolve a avaliação oftalmológica periódica, e os níveis de enzimas hepáticas também são avaliados, periodicamente, com o intuito de detectar, precocemente, os sinais de toxicidade hepática. Assim, caso seja detectada patologia na fase inicial, podem ser reversíveis com a suspensão do medicamento. O comprometimento auditivo, no entanto, tem sido ignorado e raramente investigado^{12, 15}.

Estudos sugerem possível inibição da replicação de SARS-Cov-2 pela glicosilação terminal da enzima conversora de angiotensina 2, produzida pelos vasos pulmonares, inibindo a ligação vírus-receptor. Também é relatada inibição da infecção viral por meio da elevação do pH endossômico, interferindo, assim, na fusão viral/celular. Em adição, foi observado que esse medicamento contribuiu para a prevenção da disseminação do vírus em culturas celulares¹⁶.

O efeito antiviral da cloroquina foi testado em infecções com micro-organismos intracelulares, sendo utilizada para tratamento da bactéria intracelular *Coxiella burnetii*, sendo eficaz na morte desses patógenos. Do mesmo modo, foi demonstrada atividade contra outra bactéria intracelular *Tropheryma whipplei* e tornou-se fármaco referência¹⁷.

A cloroquina também é conhecida por ação antiviral contra grande quantidade de vírus, incluindo o vírus da HIV tipo 1, vírus da hepatite B e vírus da herpes simples tipo 1. Sua ação está relacionada à alcalinização de vesículas ácidas. Quando adicionada no líquido extracelular, a porção não ionizada do fármaco entra na célula onde se torna ionizada e se concentra em organelas de pH baixo, como endossomos e complexos de Golgi. Cloroquina age na imunomodulação e suprime produção e distribuição de fator de necrose tumoral e IL-6, impedindo complicações inflamatórias de diversas doenças virais. Mediante essas qualidades, seria, portanto, uma alternativa eficaz para tratar o COVID-19¹⁷⁻¹⁹.

É necessário aprofundamento dos mecanismos de ação e dos

efeitos no aparelho auditivo, para que os pacientes usuários de tais medicamentos possam tomar medidas preventivas e, portanto, evitar maiores complicações^{20,21}.

Hidroxiclороquina

A hidroxiclороquina pode aumentar o pH intracelular e inibir a atividade lisossomal em células apresentadoras de antígenos. Esse processo reduz a ativação de células T, diferenciação e expressão de proteínas coestimuladoras e citocinas produzidas por ambas células T e B. Devido à alteração de pH dos endossomos, a interrupção da ligação de receptores *toll-like* e ligante de RNA é suprimida. No citoplasma, interfere na interação de DNA e síntese de ácidos nucleicos virais, atenuando a resposta pró-inflamatória e geração de citocinas. Ambos os mecanismos fortalecem a hipótese de que hidroxiclороquina tem habilidade de suprimir a SARS-CoV-2 por inibir hiperativação do sistema imune desencadeada pelo vírus e, assim, diminuir a progressão da doença de leve a severa, porém ainda sem comprovação clínica^{22, 23}.

A hidroxiclороquina (nome comercial: Reuquinol/Plaquenil) pode causar toxicidade retiniana, de modo assintomático. Os sintomas são indicativos de severidade. Um dos fatores mais importantes aparenta ser a dosagem e o efeito cumulativo da hidroxiclороquina. E o risco de toxicidade é maior em pacientes obesos devido à clearance do medicamento. Algumas contraindicações são: a dosagem diária recomendada não exceder 400mg, fármaco não deve ser usado por mais de 5 anos, doença renal ou hepática concomitante, doença retiniana ou maculopatia, idade maior que 60 anos^{24,25}.

Doses de hidroxiclороquina maiores que 300mg atingem pico de níveis plasmáticos no intervalo de 1-6 horas. A eliminação de hidroxiclороquina é lenta e pode ser detectada na urina durante várias semanas. Cerca de 30% do fármaco foram eliminados pelo fígado, e o restante é excretado na urina²⁰. Possui meia-vida longa: cerca de 1 mês e leva aproximadamente seis meses para atingir eliminação completa no corpo, e tal fato deve ser levado em consideração nos casos de toxicidade. A hidroxiclороquina pode desencadear ataque agudo com febre e elevação de enzimas hepáticas, sendo necessário fazer controle dos níveis de bilirrubina e atentar para sinais de toxicidade^{24, 26}.

Embora a hidroxiclороquina tenha perfil de segurança conhecido por seu uso em patologias dermatológicas e reumatológicas, existe preocupação, envolvendo sua cardiotoxicidade (síndrome de QT prolongado e cardiomiopatias) em caso de uso prolongado em pacientes com condições médicas crônicas como disfunção renal, hepática ou imunossuprimidos²⁷. Existe, ainda, risco de hemólise ou supressão de medula óssea e; por isso, deve ser monitorada a contagem de células sanguíneas^{27,28}. A toxicidade de hidroxiclороquina pode ser, rapidamente, letal, e o tratamento intensivo deve ser iniciado imediatamente^{28, 29}.

Azitromicina

Embora não tenha sido elucidado mecanismo de sinergismo

que causa potencialização da ação da hidroxiclороquina com a azitromicina, demonstrou grande importância na introdução desse medicamento no combate ao COVID-19³⁰.

A azitromicina é um antibiótico macrolídeo de uso disseminado e considerado seguro. No entanto, são comuns sintomas gastrointestinais, sintomas neurológicos, como parestesias, rash cutâneo e possível, ainda, perda auditiva. Efeitos colaterais ainda mais severos incluem eritema multiforme, miastenia gravis, trombocitopenia e quadro icterico em cerca de 1% que utiliza o fármaco^{30,31}.

Estudos recentes demonstraram que alguns antibióticos e agentes antiparasitários podem inibir a replicação viral. A azitromicina teve ação antiviral comprovada contra o zika vírus in vitro e reduziu sua proliferação em células da glia, componentes do sistema neurológico. A azitromicina pode ser utilizada, ainda, em mulheres grávidas para em regime de dose única para tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (em sua maioria, de etiologia viral). Têm sido levantadas hipóteses sobre macrolídeos que agem inibindo sincício respiratório viral ao diminuir receptores de proteínas de fusão e inibição da ativação da Rho quinase em células epiteliais das vias aéreas humanas^{32, 33}.

Em face do exposto, o presente estudo tem como objetivos abordar as evidências científicas existentes até o presente momento sobre a efetividade do uso da cloroquina, da hidroxiclороquina associada (ou não) à azitromicina para tratamento da afecção pelo coronavírus e seus possíveis efeitos adversos e tóxicos aos seres humanos.

MÉTODOS

Trata-se de uma revisão narrativa com a seguinte pergunta norteadora: “Qual a efetividade dos tratamentos do COVID-19 com o uso da cloroquina ou hidroxiclороquina associada (ou não) à azitromicina no tratamento do COVID-19 e os seus possíveis efeitos adversos e tóxicos?”

De acordo com a pergunta norteadora, foi estabelecido o “PICOS”: “P”(population): pacientes que fizeram uso de terapia medicamentosa com cloroquina ou hidroxiclороquina associada (ou não) à azitromicina. “I” (intervention): hidroxiclороquina ou cloroquina (isolada ou em associação com azitromicina). “C” (control): medidas gerais de suporte, placebo, nenhuma intervenção ou qualquer outro tratamento ativo. “O” (outcomes): reações adversas e toxicidade. S (study design): estudos clínicos.

Fontes de informação

A busca dos estudos foi realizada nas seguintes bases de dados: PubMed, LILACS, SciELO e Google Acadêmico. Esta busca foi realizada no período de 24 de março de 2020 a 10 de abril de 2020. Em adição, foi realizada busca nas referências dos estudos encontrados para maximizar fontes bibliográficas. O Medical Subject Headings (MeSH) foi utilizado para os descritores

“hydroxychloroquine”, “chloroquine”, “azithromycin”, “covid” “coronavirus”, “SARS-CoV-2”, “adverse effects”, empregados com os operadores booleanos “AND” e “OR”.

Seleção dos estudos

Após a seleção dos artigos pela estratégia de busca em cada base de dados, realizou-se um cruzamento dos artigos para a exclusão de publicações que estavam duplicadas. Após a retirada dessas, foi realizada leitura dos títulos e dos resumos dos estudos.

Critérios de elegibilidade

Foram selecionados ensaios clínicos de modo a responder à pergunta norteadora. Foram considerados elegíveis artigos disponíveis na íntegra em inglês ou português, e que descreveram sobre a efetividade ou sobre os efeitos adversos em seres humanos associados ao uso dos fármacos: cloroquina, hidroxiclороquina associada (ou não) à azitromicina no tratamento do COVID-19. Foram excluídos artigos de revisão, editoriais, cartas ao editor, relatos de casos, séries de casos, comentários, notícias, resultados de dissertações ou teses ou resumos publicados em anais de congresso ou revista científica.

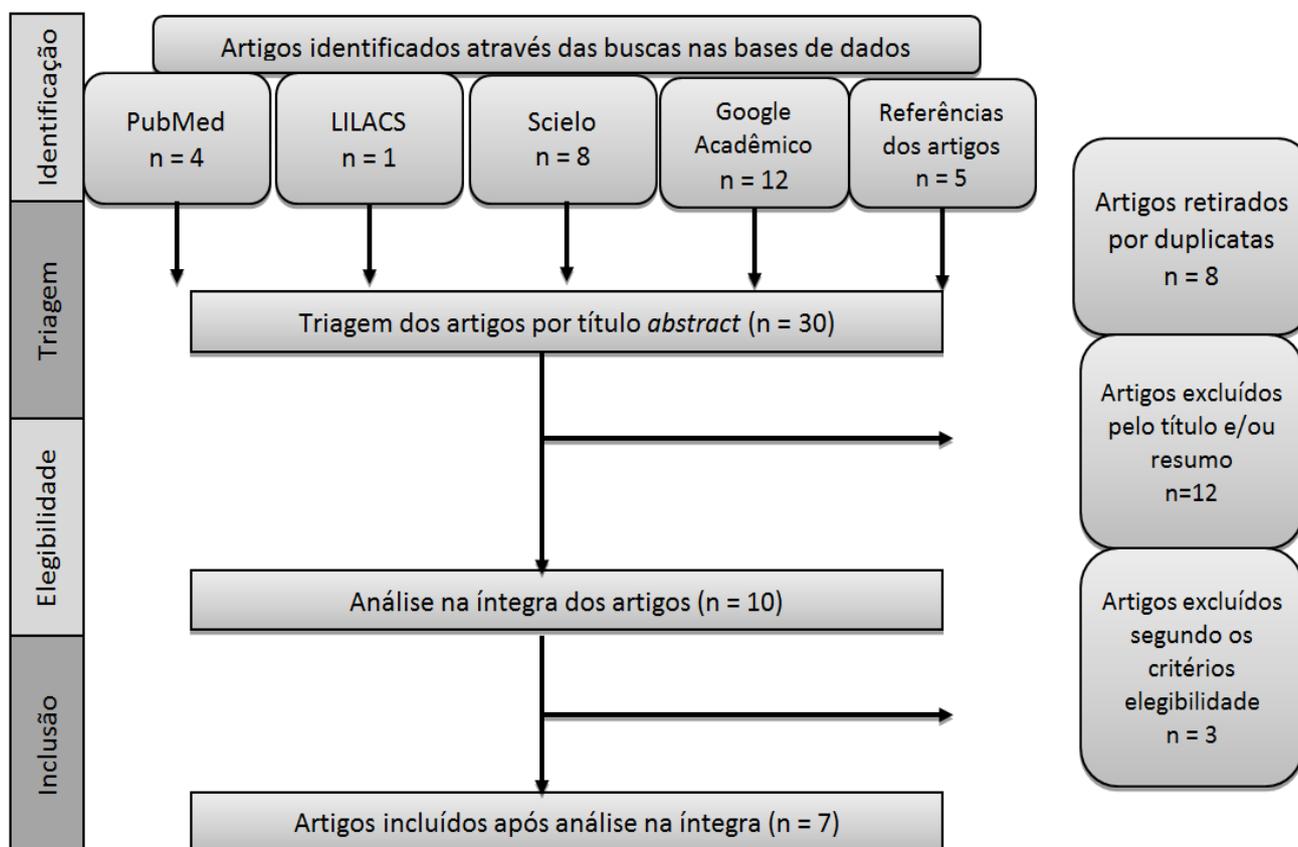
Variáveis

Foi realizada leitura na íntegra de todos os artigos que atenderam aos critérios de inclusão descritos e, durante essa fase, variáveis foram coletadas e descritas em tabela 1. As variáveis para esta revisão foram: autor, ano de publicação, localidade, tamanho da amostra, população, sexo, idade, tempo de seguimento, dose diária, grupo controle, descrição dos efeitos adversos ao medicamento, efetividade (efeito curativo ou redução da carga viral) e limitações do estudo.

RESULTADOS

Após a pesquisa com os descritores em cada base de dados, foi encontrado um total de 30 artigos, em conjunto da busca nas referências dos estudos encontrados. Sequencialmente, foi realizada triagem destes artigos, afim de retirar artigos em duplicatas (n=8), exclusão de artigos pela leitura do título e/ou resumo (n=12) e exclusão dos artigos que não atendiam aos critérios de elegibilidade supracitados. Após esta etapa, foram selecionados 10 artigos para leitura na íntegra; 3 estudos foram excluídos por não responder à pergunta de pesquisa, por incluírem estudos in vitro e não em humanos ou por não conter as variáveis de interesse, sendo por fim selecionados 7 artigos, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1. Fluxograma que resume a metodologia empregada nesta revisão acerca da efetividade e dos eventos adversos dos medicamentos cloroquina, hidroxiclороquina associada (ao não) à azitromicina



As características individuais dos estudos incluídos nesta revisão estão descritas na tabela 1. Foi observado que a maior parte dos estudos foi conduzida no continente Asiático (n=3) seguida do continente europeu (n=2), América do Sul (n=1) e América do Norte (n=1). Sem dados para a África ou Oceania. No que se refere ao tamanho amostral dos estudos, houve uma variação de 30 a 100 pacientes. O estudo de Gautret e colaboradores³³ já foi encerrado testando a eficácia do tratamento com hidroxiclороquina (neste caso, uma parcela do grupo de tratamento foi testado utilizando apenas hidroxiclороquina e outra parcela testou hidroxiclороquina em associação com a azitromicina) no tratamento de pacientes com COVID-19 (n=42). Em 27 de março de 2020 publicaram novo estudo³⁴ com maior número de pacientes (n=80) para corroborar a eficácia de seu tratamento que se encontra em andamento. O estudo de Chen J et al³⁵ e Chen Z et al²⁶ encontram-se finalizados, e o estudo de Gao et al³⁶, Barbosa et al³⁷ e Borba et al³⁸ encontram-se em andamento.

Entre os estudos selecionados Gautret e colaboradores^{33,34} representam 28% das evidências publicadas até o momento. Sendo os dois artigos pertencentes a mesma população de estudo com tamanho amostral de 42 e 80 pacientes. O grupo estudou a eficácia do tratamento com hidroxiclороquina versus hidroxiclороquina em associação com a azitromicina no tratamento de pacientes com COVID-19.

Enquanto isso, o estudo de Gao e colaboradores³⁶ e de Chen J et al³⁵ encontram-se em andamento tendo o primeiro apenas resultados parciais divulgados de 100 pacientes reagindo bem à terapia com fosfato de cloroquina e o segundo, com 30 pacientes em uso de sulfato de hidroxiclороquina. O estudo de Chen Z e colaboradores²⁶ encontra-se em andamento e testou eficácia do tratamento com sulfato de hidroxiclороquina em 62 pacientes. O estudo Barbosa e colaboradores³⁷, igualmente em andamento, avaliou resultados parciais de 63 pacientes utilizando hidroxiclороquina e já o de Borba et al³⁸ avaliou 81 pacientes e os dividiu em 2 grupos: o primeiro, avaliou o uso de cloroquina para doença do COVID-19 em alta dose e o segundo grupo com baixa dose de cloroquina, adicionando a ambos os grupos os medicamentos ceftriaxona e azitromicina.

Avaliando-se a população estudada, percebe-se que os sete estudos^{26,33-38} utilizaram pacientes de ambos os sexos. Quanto à idade, houve uma variação de 18 a 88 anos, sendo a média etária de 51,1 anos.

O tempo de seguimento variou de 6 a 14 dias. Quanto à dose diária, o estudo Gautret e colaboradores³³ usou a dose de 600 mg de hidroxiclороquina (n=20), com variação de 600 mg de hidroxiclороquina associada a 500 mg de azitromicina no primeiro dia e depois nos seguintes dias 250mg (n=6); o segundo estudo de Gautret et al³⁴, utilizou 600mg de sulfato de hidroxiclороquina durante os seis dias de tratamento associada a 500 mg de azitromicina no primeiro dia e depois 250 mg de azitromicina para os cinco dias restantes de tratamento para todos os pacientes (n=80).

O estudo de Chen J et al³⁵ usou 400mg de sulfato de

hidroxiclороquina por cinco dias, enquanto que o estudo de Gao et al³⁶ usou sulfato de cloroquina, mas não especificou a dose. No estudo de Gautret et al³³, o medicamento usado para tratar o grupo controle (n=16) foi tratamento convencional para pneumonia. O estudo de Chen J et al³⁵ tratou seu grupo controle (n=15) também utilizando tratamento convencional. O estudo de Gao et al³⁶ não especificou o medicamento utilizado em grupo controle. O estudo de Chen Z et al²⁶ utilizou sulfato de hidroxiclороquina 400mg por dia durante cinco dias (n=31) e tratou seu grupo controle (n=31) com tratamento padrão para pneumonia.

O estudo de Barbosa et al³⁷ utilizou hidroxiclороquina *off-label* de acordo com o seguinte esquema terapêutico: 400mg 2 vezes ao dia pelos 2 primeiros dias e sequencialmente, 200 a 400mg por dia, sendo 1 vez ao dia. O estudo de Borba et al³⁸ dividiu seus pacientes em dois grupos: no primeiro grupo (n=41) usou alta dose de cloroquina: 600mg 2 vezes ao dia por 10 dias e no segundo grupo (n=40) utilizou baixa dose de cloroquina: 450mg 2 vezes ao dia no primeiro dia e 450mg 1 vez ao dia por 4 dias. Nesta pesquisa desenvolvida por Borba e colaboradores³⁸ foi incluído os medicamentos ceftriaxona 1g 2 vezes ao dia por 7 dias e azitromicina 500mg 1 vez ao dia por 5 dias em ambos os grupos de tratamento.

Eventos adversos

Avaliando-se os eventos adversos, o estudo de Gautret e colaboradores³³, embora não os tenha descrito, levantou a necessidade de observação clínica desses pacientes, tendo em vista a possibilidade de desenvolvimento de síndrome de prolongamento de QT. Em seu estudo posterior³⁴, relatou efeitos adversos raros ou mínimos, não os especificando.

O estudo de Chen J et al³⁵ apresentou como efeitos adversos diarreia transitória e elevação anormal da função hepática com uso de sulfato hidroxiclороquina. Já o estudo de Gao et al³⁶ não especificou existência de efeitos adversos.

O estudo de Chen Z e colaboradores²⁶ abordou a necessidade de uso de hidroxiclороquina enquanto escassez de fármacos para tratamento específico, da doença COVID-19, porém relatou que o fármaco, por seu intenso efeito causador de retinopatia, distúrbios de condução cardíológicos e sintomas neurológicos, deve ser mais bem explorado por efeitos de overdose antes da distribuição em larga escala.

O estudo de Barbosa et al³⁷ observou como efeito adverso da hidroxiclороquina o desenvolvimento de arritmia do tipo *torsade de pointes* e o estudo de Borba et al³⁸ demonstrou desenvolvimento de miocardite, rbdmiólise e prolongamento do segmento QT (não especificando se houve arritmia) com o uso da cloroquina.

Efetividade

O tratamento com hidroxiclороquina mostrou-se eficaz na redução da carga viral em 70% (n= 18,2) dos pacientes do

6 Cloroquina e hidroxicloroquina para tratamento da COVID-19: uma revisão

estudo de Gautret *et al*³³, e sendo que 100% (n=6) do grupo tratado com associação de hidroxicloroquina com azitromicina apresentaram cura do ponto de vista de carga viral detectada dos pacientes se comparada com cura do controle de 12,5% (n=2), indicando um possível efeito sinérgico com utilização dos dois fármacos. Essa hipótese foi novamente testada em Gautret *et al*³⁴, utilizando hidroxicloroquina e azitromicina na totalidade dos pacientes e foi observada cura da doença em 97,5% dos casos (n=78).

No estudo de Chen J *et al*³⁵, 86,7% dos casos (n=13) evoluem para cura com redução da carga viral detectada em swab nasofaríngeo. O estudo de Gao *et al*³⁶ relatou 100% de cura (n=100) em pacientes com pneumonia associada com a COVID-19 mas não descreveu seus resultados devido ao

caráter em andamento do estudo. O estudo de Chen Z e colaboradores²⁶ descreveu sucesso terapêutico em 80,6% dos casos (n=25) com redução da carga viral e evidências em tomografia computadorizada torácica.

O estudo Barbosa *et al*³⁷ explicitou que os pacientes tratados com hidroxicloroquina tiveram maior necessidade de suporte ventilatório, maior risco de intubação e piora da taxa de conversão neutrófilo a linfócito. Não foi observado benefício na mortalidade, linfopenia ou conversão do sistema imune. O estudo de Borba *et al*³⁸, embora encontra-se em andamento, relatou não ter sido observada atividade antiviral da cloroquina no fim do tratamento, apenas diminuição da carga viral em secreções respiratórias.

Tabela 1. Características dos artigos selecionados para a revisão.

Estudo	Método		Resultados		Limitações do estudo			
Autor/País	Tamanho da amostra	População/sexo/idade	Tempo de seguimento	Dose diária	Grupo controle	Descrição de evento adverso medicamento	Efetividade (efeito curativo ou redução da carga viral)	
Gautret <i>et al</i> ³³ , França	42 pacientes, sendo 26 do grupo de tratamento e 16 no grupo de controle (perda de seis pacientes), totalizando 36 pacientes	Média idade: 45,1 anos, 15 homens, 11 mu-lheres	14 dias	600 mg HCQ para 20 pacien-tes, 600mg HCQ + 500 mg de AZ para seis pacientes no 1º dia e de- pois 250mg por dia para esses, por quatro dias	Tratamento padrão para pneumonia	Síndrome de QT não foi observada, porém foi realizada ressalva	100% de cura para pacientes com uso de HCQ e AZ e 57,1% de cura somente com HCQ	Número reduzido de pacientes, tempo de observação pequeno, falta de avaliação das condições de saúde e EA
Gautret <i>et al</i> ³⁴ , França	80 pacientes tratados da mesma forma (perdas de 2 pacientes), totalizando 78 pacientes	Média idade: 52,1 anos, 40 homens, 40 mu-lheres	6 dias	600 mg HCQ + 500 mg de AZ no 1º dia e depois 250mg de AZ por dia para estes, por quatro dias. Em pacientes graves, foi adicionado ceftriaxone	Não especificado	Efeito adverso ou mínimo, não especificado	78 (97,5%) de cura para pacientes, um paciente mor-reu e outro foi internado em unidade de tratamento intensivo	Número reduzido de pacientes, tempo de observação pequeno, falta de avaliação das condições de saúde e falta de descrição dos EA
Gao <i>et al</i> ³⁶ , China	100 pacientes	Não especificado	Não especificado	Fosfato de cloroquina, dose não especificada	Não especificado	Não espe- cificado	Cura total	Resultado parcial de um estudo em andamento
Chen J <i>et al</i> ³⁵ , China	30 pacientes (15 grupo de tratamento e 15 controle)	Não especificado	nove dias	400mg por dia de sulfa- to de HCQ por cinco dias e após, tratamento convencional	Tratamento convencional	4 casos do grupo de tratamento desenvol- veram diarreia transitória e função hepática anormal.	Cura em 13 (86,7%) dos ca- sos com uso de HCQ	Número reduzido de pacientes, tempo de observação pequeno, falta de avaliação das condições de saúde e de descrição dos EA encontrados
ChenZ <i>et al</i> ²⁶ , China	62 pacientes (31 grupo de tratamento e 31 controle)	Média idade: 44,7 anos, 29 homens, 33 mu-lheres	6 dias	400mg por dia de sulfa- to de HCQ por 5 dias	Tratamento convencional para pneumonia	Retinopaita, distúrbios de condução, hepatoto- xicidade não foram observa- das, porém realizada ressalva	Cura em 25 (80,6%) dos ca- sos com uso de HCQ	Número reduzido de pacientes, tempo de observação pequeno, falta de descrição dos EA
Barbosa <i>et al</i> ³⁷ , 2020, Estados Unidos da América	63 pacientes (32 grupo de tratamento e 31 controle)	Média de idade: 62,7 anos; 26 mulheres, 37 homens,	5 dias	400mg 2 vezes ao dia de HCQ por 2 dias e depois 200-400 mg de HCQ 1 vez por dia por 2 dias	Não especificado	Desenvolvimento de arritmias (torsade de pointes)	Pacientes tratados com HCQ tiveram maior necessidade de suporte ventilatório, maior risco de intubação e piora da taxa de conversão neutrófilo a linfócito. Não foi observado benefício na mortalidade, linfopenia ou conversão do sistema imune.	Número reduzido de pacientes e tempo de observação pequeno
Borba <i>et al</i> ³⁸ , 2020, Brasil	81 pacientes: 41 tratados com CQ em alta dose, 40 tratados com CQ em baixa dose	Não especificado	10 dias	Grupo de alta dose: 600mg 2 vezes ao dia por 10 dias; Grupo de baixa dose: 450 mg de CQ 2 vezes ao dia por 5 dias depois 450mg 1 vez ao dia. Ambos receberam ceftriaxona 1g 2 vezes por dia por 7 dias e AZ 500 mg/dia por 5 dias	Não especificado	Desenvolvimento de miocardite, rbdmiólie, prolongamento do segmento QT e arritmias.	Não foi observada atividade antiviral da CQ no fim do tratamento, apenas diminuição da carga viral em secreções respiratórias.	Número reduzido de pacientes e tempo de observação pequeno

HCQ = hidroxicloroquina; AZ = azitromicina; EA= eventos adversos

DISCUSSÃO

Dos sete ensaios clínicos analisados, cinco obtiveram resultados de cura e/ou remissão dos sintomas e/ou redução da carga viral dos pacientes. No entanto, é importante salientar as limitações que perpassam todos os sete estudos ao utilizarem os fármacos em concentrações maiores do que as recomendadas - nos dois estudos de Gautret^{33,34} em que são utilizadas doses diárias de 600mg, no estudo de Barbosa³⁷ 600mg 2 vezes ao dia e no estudo de Borba³⁸, 450 mg 2 vezes ao dia ao invés da dose máxima preconizada de 400mg/dia no caso de tratamento de afecções reumatológicas, sujeitando os pacientes ao desenvolvimento de efeitos adversos severos, ou mesmo a toxicidade⁸. Apesar de o uso ser em uma afecção aguda como a COVID-19 e não condições crônicas como são usados esses medicamentos normalmente, não existe relato, até o presente momento, acerca da segurança dessa dose acima da preconizada¹⁷.

Os estudos de Gautret e colaboradores^{33,34} apresentaram bons fatores de redução de carga viral. Em concordância com esse artigo, estão os estudos realizados *in vitro* ou mesmo em animais como ratos que demonstraram a cloroquina, hidroxiclороquina e azitromicina com seu potencial de ação antiviral pelo seu poder de imunomodulação e de impedir penetração no interior das células humanas^{8, 17, 32, 39}.

Os estudos que analisaram a efetividade da hidroxiclороquina no tratamento da COVID-19^{26,33-35} apresentaram, em comum, a seguinte limitação: quantidade insuficiente de ensaios realizados devido à emergência da utilização da hidroxiclороquina no contexto da pandemia do SARS-CoV-2. Também devem ser consideradas as limitações individuais dos estudos, as quais incluem: baixa população avaliada, falta de um grupo controle adequado, curto período de avaliação, uso de outras terapias medicamentosas juntamente com hidroxiclороquina (como a azitromicina, por exemplo), falta de avaliação a longo prazo, limitação nos parâmetros de avaliação dos resultados e principalmente falta de seguimento clínico dos pacientes para estudar os efeitos adversos e tóxicos desta terapêutica. Existe, ainda, uma variação nas doses de hidroxiclороquina nos estudos e não são abordados efeitos adversos de forma específica para cada dosagem utilizada³²⁻³⁹.

Ademais, o estudo de Lover²¹ apresentou resultados parciais explorando uma importante análise secundária dos resultados encontrados pelo estudo Gautret³⁴ e enfatiza sobre a quantidade insuficiente de dados para se estabelecer uso em larga escala da hidroxiclороquina no tratamento de COVID-19. O estudo de Ferner e colaboradores⁴⁰ corrobora com a linha de pensamento e relata que apesar desses medicamentos inicialmente apresentarem evidências de efetividade, a posteriori podem provar-se mais maléficis que benéficos e reafirma acerca da necessidade de estudos clínicos randomizados com a cloroquina e hidroxiclороquina. Ferner *et al*⁴⁰ relata que, no momento, excetuando-se as medidas de suporte ao paciente, que a infecção pelo SARS-CoV 2 é essencialmente intratável.

A situação atual é de medo e incertezas, mas é imprescindível que os fármacos utilizados sigam o preceito de não maleficência no combate ao coronavírus. Estudos como de Mahase¹⁴ abordam que é necessária frieza na hora de interpretar resultados pois como relata cerca de 6.000.000 de doses de cloroquina e hidroxiclороquina foram doadas aos Estados Unidos embora não haja evidência científica consistente que defenda o grande uso no combate ao SARS-CoV-2. No cenário nacional, o Ministério da Saúde disponibilizará para uso, a critério médico, os medicamentos cloroquina e hidroxiclороquina como terapia adjuvante no tratamento do COVID-19 de formas graves, em pacientes hospitalizados, sem que outras medidas de suporte sejam preteridas em seu favor, embora exista necessidade de maior investigação^{5,9}.

CONCLUSÃO

A literatura científica, de modo geral, é escassa e divergente quanto à efetividade dos medicamentos cloroquina e hidroxiclороquina associada (ou não) à azitromicina no tratamento da afecção COVID-19, pela rápida disseminação e instalação da pandemia na esfera global. É necessário a realização de ensaios clínicos pragmáticos, envolvendo um número maior de pacientes, para que seja possível analisar a efetividade no combate ao coronavírus, bem como a segurança do uso desses fármacos.

REFERÊNCIAS

- Chen Y, Li L. SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. *Lancet*, 2020 Mar; 3099(20): 30235-8. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30235-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30235-8)
- Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modelling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*. 2020 Mar 63(3):457-460. doi: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>.
- World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic [Internet]. Geneva: WHO; 2019 [acesso 2020 Abr 4]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
- Kraemer MUG, Yang CH, Gutierrez B, Wu CH, Klein B, Pigott DM, et al. The effect of human mobility and control measures on the COVID-19 epidemic in China. *Science*. 2020 Mar. doi:10.5281/zenodo.3714914
- Ceará. Governo do Estado do Ceará. Secretaria da Saúde. Nota técnica: Doença pelo novo coronavírus (COVID-19) [Internet]. Fortaleza: Secretaria de Saúde; 2020 Mar 9 [acesso 2020 Abr 11];Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/nota_tecnica_COVID19_09_03_2020.pdf.
- Ceará. Governo do Estado do Ceará. Secretaria da Saúde. Nota técnica: Teste rápido - COVID-19 [Internet]. Fortaleza: Secretaria de Saúde; 2020 Abr 9 [acesso 2020 Abr 12]. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2020/02/NOTA_TE%CC%81CNICA_TESTE_RA%CC%81PIDO_COVID_19.pdf
- Walker PGT, Whittaker C, Watson O, Baguelin M, Ainslie KEC, Bhatia S, et al. The Global Impact of COVID-19 and Strategies for Mitigation and Suppression. Imperial College. 2020 Mar. doi: <https://doi.org/10.25561/77735>

8 Cloroquina e hidroxicloroquina para tratamento da COVID-19: uma revisão

8. Liu J, Cao R, Xu M, Zhang H, Hu H, Li Y, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* 2020 Dez. doi: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0>.
9. Ministério da Saúde (BR). Nota Informativa No 5/2020-DAF/SC/IE/MS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020 Mar 27. [acesso 2020 Mar 30]. Processo no 25000.042783/2020-81. Disponível em: https://cdn.oantonista.net/uploads/2020/03/nota_cloroquina.pdf.
10. Assessoria de Comunicação Anvisa. Covid-19: liberada pesquisa com hidroxicloroquina [Internet]. Brasília: Anvisa; 2020 Mar 27 [acesso 2020 Mar 30] Anvisa Ação Estratégica. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/covid-19-liberada-pesquisa-com-hidroxicloroquina/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR.
11. Waldrop T, Alsup D, McLaughlin EC. Fearing coronavirus, Arizona man dies after taking a form of chloroquine used to treat aquariums. *CNN*, Phoenix, 24 de março de 2020. *CNN Health*. Disponível em: <https://edition.cnn.com/2020/03/23/health/arizona-coronavirus-chloroquine-death/index.html>. Acesso em: 24 de março de 2020.
12. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*. 2015 Out; 23(5):231-69. doi: 10.1007/s10787-015-0239-y. Epub 2015 Aug 6.
13. Telek HH, Yesilirmak N, Sungur G, Ozdemir Y, Yesil NK, Ornek F. Retinal toxicity related to hydroxychloroquine in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Doc Ophthalmol*. 2017 Dec;135(3):187-194. doi: 10.1007/s10633-017-9607-9. Epub 2017 Aug 29.
14. Mahase E1. Covid-19: six million doses of hydroxychloroquine donated to US despite lack of evidence. *BMJ*. 2020 Mar; 368. doi: 10.1136/bmj.m1166.
15. Lanvers-Kaminsky C, Zehnhoff-Dinnesen AA, Parfitt R, Ciarimboli G. Drug-induced ototoxicity: Mechanisms, Pharmacogenetics, and protective strategies. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 Apr; 101(4): 491-500. doi: 10.1002/cpt.603.
16. Rosa SGV, Santos WC. Clinical trials on drug repositioning for COVID-19 treatment. *Rev Panam Salud Publica*. 2020; 44:e40. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.40>
17. Colson P, Rolain JM, Lagier JC, Brouqui P, Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Mar;105932. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105932.
18. Delvecchio R, Higa LM, Pezzuto P, Valadão AL, Garcez PP, Monteiro FL, et al. Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. *Viruses*. 2016 Dez; 8(12): 322. doi: 10.3390/v8120322.
19. Teixeira, RA, Martinelli Filho M, Benvenuti LA, Costa R, Pedrosa AA e Nishioka SAD. (2002). Cardiac Damage from Chronic Use of Chloroquine: A Case Report and Review of the Literature. *Arq. Bras. Cardiol*. 2002 Jul; 79(1): 85-88. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2002001000009>
20. Hickley NM, Al-Maskari A, McKibbin M. Chloroquine and Hydroxychloroquine Toxicity. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(11):1506–1507. doi:10.1001/archophthalmol.2011.321
21. Lover AA. Quantifying treatment effects of hydroxychloroquine and azithromycin for COVID-19: a secondary analysis of an open label non-randomized clinical trial (Gautret et al, 2020). *MedRxiv*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.20040949>.
22. Geamănu Pancă A, Popa-Cherecheanu A, Marinescu B, Geamănu CD, Voinea LM. Retinal toxicity associated with chronic exposure to hydroxychloroquine and its ocular screening. *Review. J Med Life*. 2014 Set; 7(3): 322-6. PubMed PMID: 25408748.
23. Zhou D, Dai SM, Tong Q. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression, *J Antimicrob Chemotherapy*. 2020 Mar. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa114>.
24. Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Melles RB, Mieler WF, American Academy of Ophthalmology. Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology*. 2016 Jun; 123(6):1386-94. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.01.058.
25. Sundelin SP, Terman A. Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS*. 2002 Jun;110(6):481-9.
26. Chen Z, Hu J, Zhang Z, Jiang SS, Han S, Yan D, et al. Efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial. *MedRxiv*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.20040758>
27. Ochsendorf FR, Runne U. [Chloroquine and hydroxychloroquine: side effect profile of important therapeutic drugs]. *Hautarzt*. 1991 Mar; 42(3):140-6.
28. Adams EM, Yocum DE, Bell CL. Hydroxychloroquine in the treatment of rheumatoid arthritis. *Amer J Med*. 1983 Ago; 75(2): 321-326. doi: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)91211-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)91211-1).
29. Li G, De Clercq E; Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV); *Nature Reviews Drug Discovery*; 2020; 19; 149-150
30. Das BK. Azithromycin induced hepatocellular toxicity and hepatic encephalopathy in asymptomatic dilated cardiomyopathy. *Indian J Pharmacol*. 2011 Nov; 43(6):736-7. doi: 10.4103/0253-7613.89841. PubMed PMID: 22144789.
31. Ray WA, Murray KT, Hall K, Arbogast PG, Stein CM. Azithromycin and the Risk of Cardiovascular Death. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1881-1890. doi: 10.1056/NEJMoa1003833.
32. Bosseboeuf E, Aubry M, Nhan T, Pina JJ, Rolain JM, Raoult D et al. Azithromycin Inhibits the Replication of Zika Virus. *J Antivir Antiretrovir*. 2018, 10: 6-11. doi: 10.4172/1948-5964.1000173.
33. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Medded L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Mar; 105949. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105949>.
34. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Medded L, Sevestre J, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID-19 patients with at least a six-day follow up: an observational study. *Mediterranean Infection [Internet]*. Mar 2020 [acesso 2020 Mar 30]. Disponível em: <https://www.mediterranean-infection.com/wp-content/uploads/2020/03/COVID-IHU-2-1.pdf>.
35. Chen J, Liu D, Liu L, Liu P, Xu Q, Xia L, et al. A pilot study of hydroxychloroquine in treatment of patients with common coronavirus disease-19 (COVID-19). *J Zhejiang Univ (Med Sci)* 2020; 49(1). doi: 10.3785/j.issn.
36. Gao J, Tian Z, Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Biosci Trends*. 2020 Mar;14(1):72-73. doi: 10.5582/bst.2020.01047. Epub 2020 Feb 19.
37. Barbosa J, Kaitis D, Freedman R, Le K, Lin X. Clinical Outcomes of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with COVID-19: A Quasi-Randomized Comparative Study. *N Engl J Med [Internet]*. 2020 Abr 4 [acesso em 2020 Abr 4]. Disponível em: https://covid19.afpikerala.in/doc/NEJM_Clinical%20Outcomes%20of%20Hydroxychloroquine%20in%20Patients%20with%20COVID19.pdf.
38. Borba MGS, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Brito M, et al. Chloroquine diphosphate in two different dosages as adjunctive therapy of hospitalized patients with severe respiratory syndrome in the context of coronavirus (SARS-CoV-2) infection: Preliminary safety results of a randomized, double-blinded, phase IIb clinical trial (CloroCovid-19 Study). *MedRxiv* J. Health Biol Sci. 2020; 8(1):1-9

[Internet]. 2020 Abr 10 [2020 Abr 12]. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.07.20056424v1.article-info>. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.20056424>.

39. Keyaerts E, Li S, Vijgen L, Rysman E, Verbeeck J, Ranst MV, et al. Antiviral Activity of Chloroquine against Human Coronavirus OC43 Infection in Newborn

Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul 2009, 53(8) 3416-3421; doi: 10.1128/AAC.01509-08.

40. Ferner RE, Aronson JK. Chloroquine and hydroxychloroquine in covid-19. *BMJ* [Internet]. 2020 Abr 8 [acesso 2020 Abr 12]; 369: m1432. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32269046>. doi: 10.1136/bmj.m1432.

Como citar este artigo/How to cite this article:

Menezes CR, Sanches C, Chequer FMD Efetividade e toxicidade da cloroquina e da hidroxicloroquina associada (ou não) à azitromicina para tratamento da COVID-19. O que sabemos até o momento?. *J Health Biol Sci*. 2020 J; 8(1):1-9.

J. Health Biol Sci. 2020; 8(1):1-9