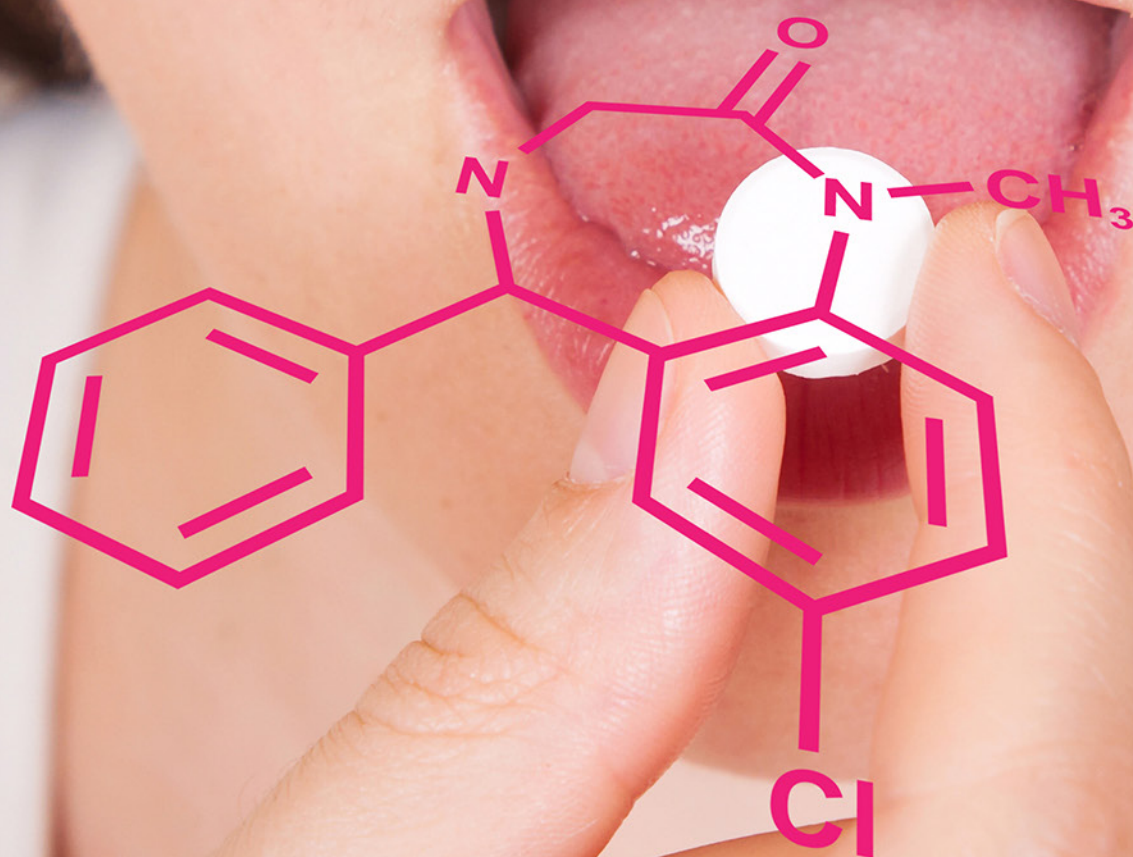


E-ISSN 2340-9894 · EDITA: FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Ars Pharmaceutica

Vol. 62(4) · Octubre-Diciembre 2021



E-ISSN 2340-9894

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

Actualmente se encuentra indexada en las siguientes bases de datos/directorios/repertorios: EMERGING SOURCE CITATION INDEX (ESCI), EBSCO, EMBASE, DIALNET, DOAJ, GOOGLE ACADEMICO, LATININDEX, REDIB, SCIELO, SCOPUS IBECS, MIAR y es nuestra intención aumentar su presencia en otras bases.

Se han establecido de forma clara las distintas categorías de trabajos que se pueden publicar. Para agilizar el envío de originales a través de la web se ha desarrollado un sistema electrónico de envío. Se han habilitado recursos humanos y económicos, que nos permiten ofrecer la revista en formato electrónico y de forma gratuita a todos los científicos y profesionales interesados.

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

En el año 2020 se le ha renovado el sello de calidad editorial otorgado por la FECYT, por un periodo de tres años. Por ello desde aquí invitamos a todos los autores a enviar sus aportaciones a las distintas secciones de la revista.

Los informes proporcionados por SCImago Journal & Country Rank en 2019, colocan a nuestra revista en el campo de las ciencias farmacéuticas con un índice H de 19 y un SJR de 0,121.

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

Es deseo de este Comité Editorial y del Equipo Decanal de la Facultad de Farmacia de seguir avanzando en el decidido empeño de conseguir la entrada en el ISI, para ello queremos seguir contando con el apoyo de investigadores y profesionales de las Ciencias farmacéuticas y la ayuda desinteresada de cuantos revisores integran el cuadro de experto de esta revista en sus distintas áreas.

Contacto de la Redacción

Editorial Office Contact Info

Ars Pharmaceutica.

Facultad de Farmacia.

Universidad de Granada.

Campus de Cartuja s/n.

18071 -Granada. España

email: ars@ugr.es

Edita

Scientific Editor

Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

Publica

Publisher

Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

Campus de Cartuja, s.n.

18071 - GranadaEspaña | Spain

Editada bajo licencia CC 4.0 BY-NC-SA.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

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

<http://revistaseug.ugr.es/index.php/ars>

Equipo Editorial

Director

Dr. Fernando Martínez-Martínez, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Directora Ejecutiva

Dra. María José Faus, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Editora

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

Coordinadores de área

Atención Farmacéutica

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

Farmacia Clínica

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

Química Farmacéutica

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

Salud

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

Radiofarmacia

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

Tecnología Farmacéutica

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

Estudios clínicos

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

Legislación y Gestión farmacéutica

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

Consejo Asesor

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Antonio Perez de la Cruz. Clínica. Hosp. Virgen de las Nieves, Granada. España

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

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

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

Dr. Bartolomé Quintero, Físicoquímica. Univ. de Granada. Granada, España

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

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

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

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

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

Sumario Contents

Artículos Originales / Original Articles

- 348-357 AVIJIT HAZRA, DIPANKAR BHATTACHARYYA, ALOK KUMAR HAZRA, TAPAS KUMAR SUR
Antiradical and antiulcer effect of *Sonneratia apetala* Buch-Ham leaves against alcohol induced gastric mucosal injury
*Efecto antirradical y antiulceroso de las hojas de *Sonneratia apetala* Buch-Ham contra la lesión de la mucosa gástrica inducida por el alcohol*
- 358-370 LEONARDO HENRIQUE TOEHWÉ, THIAGO DA SILVA HONORIO, LUIZ CLAUDIO RODRIGUES PEREIRA DA SILVA, THALITA MARTINS DA SILVA, LUCIANA DA ROCHA PITTA, LIVIA DERIS PRADO, LUCIO MENDES CABRAL, HELVÉCIO VINÍCIUS ANTUNES ROCHA
In silico bioavailability evaluation of different prednisone tablets formulations through in vivo bioequivalence studies
Evaluación de la biodisponibilidad in silico de diferentes formulaciones de comprimidos de prednisona mediante estudios de bioequivalencia in vivo
- 371-378 JUAN NÚÑEZ-VALDÉS, ANTONIO RAMOS CARRILLO
La farmacéutica Milagro Almenara Pérez, del olvido a su reconocimiento
The pharmacist Milagro Almenara Pérez, from oblivion to her recognition
- 379-388 ALFONSO NOGUERA-PEÑA, CARLOS DEL CASTILLO-RODRÍGUEZ
Medicamentos de elaboración o preparación no industrial: una nueva propuesta de clasificación
Non-industrially elaborated or prepared drugs: a new classification proposal

- 389-403 YAILY LAZO ROBLEJO, MARAELYS MORALES GONZÁLEZ
Resistencia a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR en el tratamiento del carcinoma de cabeza y cuello
Resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of head and neck carcinoma
- 404-418 CRISTINA CANTOS-AZORÍN, JAVIER SANZ-VALERO
Consecuencias derivadas de la automedicación con benzodiazepinas en personas adultas: revisión exploratoria
Consequences derived from self-medication with benzodiazepines in adults: scoping review
- 419-437 LAURA PASTOR, MARIA ALVAREZ-SOTOMAYOR
¿Reducen las estatinas el riesgo de glaucoma? revisión de las evidencias
Do statins reduce the risk of glaucoma? review of the evidences
- 438-450 JOSÉ MARÍA GÁLVEZ-NAVAS, CRISTINA PÉREZ-RAMÍREZ, MCARMEN RAMÍREZ-TORTOSA
Secreted Frizzled – Related Protein 4 y el cáncer de mama
Secreted Frizzled – Related Protein 4 and breast cancer
- 451-470 ALBERTO CALLE-MORIEL, MARÍA LUISA GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ
Avances en las formulaciones de los antisépticos
Advances in antiseptic formulations
- 471-481 ARLENE LORÍA GUTIÉRREZ, JEIMMY BLANCO BARRANTES, MARTA PORRAS NAVARRO, MARÍA CELESTE ORTEGA MONGE, MARÍA JOSÉ CERDAS VARGAS, GERMAN L MADRIGAL REDONDO
General aspects about *Allium sativum* – a review
Aspectos generales del Allium sativum - una revisión

doi: 10.30827/ars.v62i4.20759

Artículos originales

Antiradical and antiulcer effect of *Sonneratia apetala* Buch-Ham leaves against alcohol induced gastric mucosal injury

Efecto antirradical y antiulceroso de las hojas de *Sonneratia apetala* Buch-Ham contra la lesión de la mucosa gástrica inducida por el alcohol

Avijit Hazra¹

Dipankar Bhattacharyya¹

Alok Kumar Hazra²

Tapas Kumar Sur^{1,3}  0000-0003-0835-2564

¹Department of Pharmacology, Institute of Post Graduate Medical Education & Research, Kolkata, India

²RKM Vivekananda Educational & Research Institute, Kolkata, India

³Multidisciplinary Research Unit, R.G. Kar Medical College, Kolkata, India

Correspondence

Dr. Tapas Kumar Sur

E-mail: drtapaskumarsur@gmail.com

Received: 05.03.2021

Accepted: 05.05.2021

Published: 20.09.2021

Acknowledgement

We would like to thank Director, I.P.G.M.E & R, Kolkata for providing the permission and facilities to conducting research.

Financial support

This work has been funded by Project 537(sanc)/ST/P/S&T/5G-4/2009-11 of the Department of Science & Technology, Govt. of West Bengal, India

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Resumen

Introducción: *Sonneratia apetala* Buch-Ham es un verdadero habitante de los manglares en Sunderban indio y se utiliza en la medicina popular para los trastornos digestivos.

Método: El extracto hidrometanólico (20:80) de hojas de *Sonneratia apetala* (SA) se estandarizó químicamente por HPTLC y se evaluó por sus propiedades antirradicales y gastroprotectoras. Se determinaron los fenólicos y flavonoides presentes en SA y se evaluaron las actividades antirradicales mediante métodos *in vitro* como, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), óxidos nítricos, superóxidos, hidroxilo y ABTS (2,2' -azino-bis- Ácido 3-etilbenziazolin-6-sulfónico). Además, se evaluó la eficacia gastroprotectora de SA en la ulceración oxidativa inducida por alcohol (50% v / v, 5 ml / kg) en ratas.

Resultados: El SA químicamente estandarizado mostró presencia de compuestos polifenólicos. También mostró fuertes propiedades antirradicales. Las administraciones orales de SA (125 mg / kg y 250 mg / kg) protegieron significativamente la membrana mucosa gástrica del daño ulcerativo causado por el alcohol, similar al omeprazol (20 mg / kg) en ratas. Además, el tratamiento con SA redujo significativamente la elevación de los peróxidos de lípidos; mientras que aumentó la concentración de glutatión y catalasa en la mucosa gástrica con respecto a las ratas de control no tratadas inducidas por etanol.

Conclusiones: Los resultados obtenidos de este estudio sugieren que la hoja de *Sonneratia apetala* tiene propiedades antioxidantes y tiene capacidad para proteger la lesión de la mucosa gástrica causada por la ingestión de alcohol.

Palabras clave: Antioxidante; Alcohol; Mangle; HPTLC; Antiulceroso; Fenólicos.

Abstract

Introduction: *Sonneratia apetala* Buch-Ham is a true mangrove inhabitant in Indian Sunderban and it is used in folk medicine for digestive disorders.

Method: Hydro-methanolic (20:80) extract of *Sonneratia apetala* leaves (SA) was chemically standardized by HPTLC and evaluated for its antiradical and gastro-protective properties. Phenolics and flavonoids present in SA were determined and antiradical activities were assessed by *in vitro* methods like, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), nitric oxides, superoxides, hydroxyl and ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid). Further, gastro-protective efficacy of SA was assessed in alcohol (50% v/v, 5 ml/kg) induced oxidative ulceration in rats.

Results: Chemically standardized SA exhibited presence of polyphenolic compounds. It also showed strong antiradical properties. Oral administrations of SA (125 mg/kg and 250 mg/kg) significantly protected gastric mucosal membrane from ulcerative damage caused by alcohol, similar to Omeprazole (20 mg/kg) in rats. Moreover, SA treatment significantly reduced the elevation of lipid peroxides; while enhanced the concentration of glutathione and catalase in gastric mucosa in respect to ethanol induced untreated control rats.

Conclusions The results obtained from this study suggest *Sonneratia apetala* leaf has antioxidant properties and has capabilities to protect gastric mucosal injury caused by alcohol ingestion.

Keywords: Antioxidant; Alcohol; Mangrove; HPTLC; Antiulcer; Phenolics

Highlights

Present study exhibited the chemical nature and the medicinal properties of *Sonneratia apetala* Buch-Ham leaf habitat in Indian Sunderban. It contained small polyphenolic compounds and has strong antioxidant and antiulcer properties. It may lead to the development of effective compound(s) for the treatment in gastric ulcers, particularly in alcohol addicted population.

Introduction

It has been accepted that 75% of world's mangroves located in just 15 countries mainly in Asia, Africa, North and Central America⁽¹⁾. Indian Sunderban having the highest taxa diversity of mangrove with 69 species, 49 genera, 35 families⁽²⁾. *Sonneratia apetala* Buch-Ham (local name *Keora*) is predominant mangrove in Indian Sunderban. The bark, root, leaves and fruits have been used in folk medicine in the South Asian countries including India for treating diarrhoea, hepatitis, inflammation, wounds, ulcers⁽³⁻⁶⁾. Several bioactive constituents including fatty acids, triterpenoids and sterols from the aerial parts of *S. apetala* have been obtained⁽⁷⁻⁸⁾. Sadhu *et al.* (2006)⁽⁹⁾ reported *S. caseolaris* leaves have two flavonoids with antioxidant activities. Antioxidants defend against oxidative stress caused by necrotic agents are important factors to defend the gastric mucosa⁽¹⁰⁾. Plant derived antioxidants, especially phenolic acids and flavonoids have been extensively studied for anti-ulcerogenic efficacy⁽¹¹⁾. There is little information on the pharmacological activities of *S. apetala*. Perhaps, alcohol consumption has been considered one of the most important factors to aggravate gastric ulcer in humans. For this purpose, we studied the role of *Sonneratia apetala* leaves in oxidative stress and focused on its active ingredients and protection against alcohol induced gastric ulcers in rats.

Methodes

Animals

Adult Wistar strain male albino rats, average body weight 175-180 g were procured from the registered animal breeder (M/s Saha Enterprise, Kolkata, Regn No. 1828/PO/Bt/S/15/CPCSEA) and used for this study. Principles of laboratory animal care guidelines were strictly followed⁽¹²⁾. The animals were maintained under 12:12 hours dark: light cycle, controlled temperature (22±3°C), with balanced diet and water *ad libitum*. Institutional Animal Ethical Committee (544/c/PO/02/CPCSEA) approved the experimental protocol. All the experiments were performed between 08:00-16:00 h.

Test drug preparation

The leaves of *Sonneratia apetala* Buch.-Ham were collected from the mangrove forest area of Indian Sunderban, West Bengal and identified by Botanical Survey of India, West Bengal. A voucher specimen (DST/537/5G-4/09-05) was deposited in the departmental herbarium. The shade dried and powdered leaves of *S. apetala* were extracted with hydro-methanol (20-80%) in soxhlet apparatus and concentrated by distilling the solvents and dried under reduced pressure. The extractive value was determined by gravimetric method and expressed as percentage yield. The bioactive phytoconstituents presences in hydro-methanolic extract of *S. apetala* (SA) were evaluated⁽¹³⁾. In brief, presence of alkaloids in SA was examined by Dragendorff's test, sterols and triterpenoids by Liebermann-Burchard's test, saponins by Froth test, tannins by lead acetate test, carbohydrates by Fehling's test, reducing sugars by Benedict's test, proteins by Millon's test, phenolics by ferric chloride test, flavonoids by aluminum chloride test and glycosides by Bortrager's test.

HPTLC Standardization

Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), quercetin (5,7,3',4' tetrahydroxy flavonol) and coumarin (1,2-benzopyrone), three known biomarkers were used to standardize the extract⁽¹⁴⁾. SA was diluted with methanol (1 mg/ml) and spotted in the form of bands over a pre-coated silica gel plates (Merck,

60F₂₅₄, 20x20 cm) using Camag Linomat 5 applicator. The plates were developed in the solvent system (toluene:ethyl acetate:formic acid = 4.5:3:0.2) for 30 min. The densitometric scanning was performed on Camag TLC Scanner 3 at 280 nm. The amount of gallic acid, quercetin and coumarin present in SA was calculated against respective standards and expressed per mg of extract.

Estimation of phenolic

Total phenolic in SA was determined as described earlier⁽¹⁴⁾. In brief, to 0.2 ml of SA solution (1 mg/ml methanol), 1.0 ml of Folin-ciocalteu reagent was added and incubated in dark for 5 min. Then, 0.8 ml sodium carbonate solution (7.5%) was mixed and kept in dark for 30 min at room temperature. Finally, 3 ml of deionized water was added and read at 765 nm (Ultrospec 2000 UV-visible spectrophotometer, Pharmacia Biotech, USA). Total phenolic content was expressed as gallic acid equivalent (GAE) in µg per mg of extract.

Estimation of flavonoids

Aluminum chloride method was employed for flavonoids estimation⁽¹⁵⁾. In brief, 0.2 ml of SA (1 mg/ml methanol) was added to 0.8 ml methanol, 0.1 ml of 10% aluminum chloride, 0.1 ml of 1 M potassium acetate and 2.8 ml of deionized water and read after 30 min at 415 nm and expressed as quercetin equivalent (QE) in µg per mg of extract.

Estimation of reducing power

The reducing power of SA was evaluated as described earlier⁽¹⁴⁾. In brief, 0.1 ml of SA was mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide and incubated at 50°C for 20 min. Then, 2.5 ml of 10% Trichloroacetic acid was added to the mixture and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with deionized water (2.5 ml) and ferric chloride solution (0.5 ml, 0.1%) and read at 700 nm. Reducing power was expressed as ascorbic acid equivalent (AAE) in µg per mg of extract.

Estimation of DPPH radical scavenging

The radical scavenging activity of SA was determined using the stable radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)⁽¹⁵⁾. In brief, 0.1 ml of SA in methanol at different known concentrations was mixed with 3.9 ml of DPPH solution (0.135 mM) and read after 30 min at 517 nm. Butylated hydroxyl toluene (BHT) was used as positive control. The sample concentration required to scavenge 50% of DPPH (IC₅₀) was determined.

Estimation of superoxide anion radical scavenging

The incubation mixture contained 3 ml of Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.75 ml of nitroblue tetrazolium (300 µM) solution, 0.75 ml of NADH (936 µM) solution and 0.3 ml of SA at different concentrations (10-100 µl in methanol). The reaction started after adding 0.75 ml of phenazine methosulphate (120 µM) to the mixture. The reaction mixture was exposed to light at room temperature for 5 min and thereafter, read at 560 nm⁽¹⁴⁾. L-Ascorbic acid was used as positive control. The percent inhibition of superoxide anion generation of SA was calculated and was expressed as IC₅₀.

Estimation of nitric oxide radical scavenging

Test extract (10-100 µl in methanol) was mixed to 0.5 ml of 1 M phosphate buffer saline, 2 ml of 10 mM sodium nitroprusside and kept in room temperature for 150 min. Potassium nitrite solution was used as standard. After incubation, 0.5 ml of the reaction mixture containing nitrite was transferred and mixed with 1 ml of 0.33% sulphanilic acid reagent and allowed to stand for 5 min for completing diazotization. Then, 1 ml of 1% naphthylethylene diamine dihydrochloride was added and read after 30 min at 540 nm⁽¹⁶⁾.

Estimation of hydroxyl radical scavenging

The reaction mixture contained 0.1 ml deoxyribose (2.8 mM), 0.1 ml ferric chloride (0.1 mM), 0.1 ml EDTA (0.1 mM), 0.1 ml hydrogen peroxide (1 mM), 0.1 ml ascorbate (0.1 mM), 0.1 ml phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) and 1 ml of SA (10-100 µl in methanol). The mixture was incubated at 37°C for 1 h. At the end of the incubation period, 1.0 ml thiobarbituric acid (1%) was added and heated at 95°C for 20 min. After cooling, the thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) formation was measured at 532 nm⁽¹⁴⁾. The percent TBARS production for positive control (H₂O₂) was fixed at 100% and the relative percent TBARS was calculated for the extract treated groups.

Estimation of ABTS radical scavenging

In brief, stock solution included ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid) solution (7 mM) and ammonium persulphate (2.45 mM) and working ABTS⁺ solution was then prepared by mixing the two stock solutions in equal quantities and allowing them to react for 12-16 h at room temperature in the dark. The final working ABTS⁺ solution was obtained after appropriate dilution with methanol (OD 0.7 at 734 nm). SA (10-100 µl in methanol) was added to 1 ml of ABTS⁺ solution and after 7 min read at 734 nm⁽¹⁵⁾. The percent inhibition was calculated and expressed as IC₅₀.

Antiulcer activity in rats

Antiulcer activity of SA was evaluated on alcohol-induced gastric ulcers in rats as described by Morimoto and coworkers (1991)⁽¹⁷⁾ with slight modification⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Omeprazole (20 mg/kg, p.o) was used as standard prototype agent. All rats (body weight 150-175 g) were divided into five groups (N=6) as follows: Group I (normal control), Group II (treated control), Group III (SA 125 mg/kg), Group IV (SA 250 mg/kg) and Group V (Omeprazole 20 mg/kg). All animals were pre-treated according to above protocol for 10 days by oral route. On day 10, 50% alcohol at the dose of 5 ml/kg was administered orally to all rats (except normal control). Normal control rats were received distilled water (5 ml/kg). The last dose of all test drugs was given 1 h prior to alcohol administration. All animals were sacrificed under anesthesia (sodium pentothal 40 mg/kg, i.p) two hours after alcohol ingestion. The stomach was incised along the greater curvature and examined for gastric lesions. The gastric ulcer was scored and indexed as follows⁽²⁰⁾.

Ulcer Index = (number of lesions I) + (number of lesion II) X 2 + (number of lesion III) X 3

I=presence of edema, hyperemia and single submucosal punctiform haemorrhages

II=presence of submucosal punctiform hemorrhagic lesions with small erosions

III=presence of deep ulcer with erosions and invasive lesions

Moreover, gastric mucosal tissues were dissected out and a portion was homogenized in cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2), centrifuged and used for estimation of glutathione, catalase, lipid peroxides and protein⁽¹⁹⁻²²⁾.

Statistical analysis

Data have been summarized by routine descriptive statistics. All statistical analyses were performed using statistical software package (SPSS, version 17.0, IBM, USA). Differences between and within groups have been assessed for statistical significance by standard parametric and non-parametric tests, as appropriate. 'P' value < 0.05 was taken as level of statistical significance in all tests.

Results

Chemical standardization. Presence of major bioactive phytoconstituents like, phenolics, flavonoids, triterpenoids, steroids and tannins are observed in SA. The yield or extractive value was found to 14.9%. As shown in Table 1, SA contains high amount of phenolics acids and flavonoids. Moreover, HPTLC chromatogram shows distinct peaks for gallic acid (peak 3), quercetin (peak 4) and coumarin (peak 5) in SA (Fig. 1). R_f values of gallic acid, quercetin and coumarin are 0.20, 0.42 and 0.51 respectively.

Table 1. Chemical constituents in *Sonneratia apetala*

| | Phenolics (mg GAE/mg extract) | Flavonoids (mg QE/mg extract) | HPTLC densitometric quantification (µg/mg extract) | | |
|----|----------------------------------|----------------------------------|---|-------------|-------------|
| | | | Gallic acid | Quercetin | Coumarin |
| SA | 7.37 ± 0.501 | 7.41 ± 0.209 | 31.77±0.654 | 20.52±0.080 | 55.13±0.243 |

Values are mean±SE of triplicate samples; SA:hydro-methanolic (20:80) extract of *Sonneratia apetala* leaves; GAE:-gallic acid equivalent; QE:quercetin equivalent

Antiradical activities. *In vitro* antiradical properties of SA are exhibited in Table 2. The mangrove extract exhibits strong reducing abilities, DPPH radical scavenging activity and cation (ABTS⁺) inhibitory properties. The extract also inhibits nitric oxide generation, superoxide radical formation and hydroxyl radical activities in a dose dependant manner.

Table 2. *In vitro* antioxidant activities of *Sonneratia apetala*

| Assay/Test | IC ₅₀ (mg/ml SA extract) |
|---|-------------------------------------|
| Reducing power | 156.61±3.50 |
| DPPH [•] scavenging | 0.81±0.01 |
| NO radical scavenging | 2.04±0.03 |
| O ₂ ^{•-} scavenging | 2.79±0.02 |
| HO [•] scavenging | 1.42± 0.08 |
| ABTS ^{•+} scavenging | 0.16±0.003 |

Mean ± SE of triplicate samples; SA: hydro-methanolic (20:80) extract of *Sonneratia apetala* leaves; IC₅₀:50% inhibitory concentration

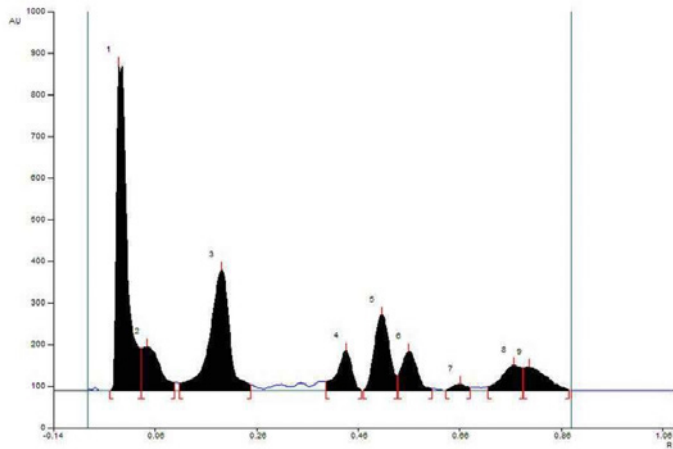


Figure 1. HPTLC chromatogram of *Sonneratia apetala* leaves

Antiulcer activity. There are significant differences in gastric mucosal damage score among alcohol induced control, Omeprazole (20 mg/kg) and SA (125 and 250 mg/kg) treated groups (Table 3). Further, compare with the alcohol group, SA pre-treatment shows a dose dependent protection from ulcer lesion similar to standard Omeprazole. Moreover, SA pre-treatment significantly and dose dependently reduce the elevation of lipid peroxides, while enhance the concentration of glutathione and catalase

in gastric mucosa in respect to alcohol induced control. Omeprazole also diminishes lipid peroxidation and enhances the level of glutathione and catalase in gastric tissues.

Table 3. Anti-ulcer action of *Sonneratia apetala* leaves

| Groups | Dose (p.o) | Ulcer Index | Gastric tissue | | |
|----------------|------------|---|---|--|--|
| | | | Lipid peroxides (nM MDA/mg protein) | Glutathione (nM/mg protein) | Catalase (mM of H ₂ O ₂ decomposed/min/mg protein) |
| Normal control | 5ml/kg | - | 0.18±0.012 | 1.75±0.04 | 2.27±0.036 |
| EtOH | 5ml/kg | 33 ± 1.57 | 0.43 ± 0.014 ^{a****} (138.88) | 0.67 ± 0.02 ^{a****} (-61.71) | 0.58 ± 0.039 ^{a****} (-172.41) |
| SA+EtOH | 125mg/kg | 23.8 ± 1.13 ^{b**} (-27.87) | 0.36 ± 0.016 ^{b*} (-16.27) | 0.82 ± 0.03 ^{b**} (22.38) | 0.88 ± 0.025 ^{b***} (51.72) |
| SA+EtOH | 250mg/kg | 18.1 ± 0.60 ^{b***} (-45.15) | 0.30 ± 0.012 ^{b***} (-30.23) | 0.95 ± 0.04 ^{b***} (41.79) | 0.94 ± 0.027 ^{b***} (62.06) |
| OMZ+EtOH | 20mg/kg | 15 ± 0.81 ^{b***} (-54.5) | 0.26 ± 0.14 ^{b***} (-39.53) | 1.02 ± 0.02 ^{b***} (52.23) | 0.99 ± 0.042 ^{b***} (70.68) |

Values are mean ± SE; EtOH: alcohol (50% v/v); OMZ: Omeprazole (20 mg/kg); SA: hydro-methanolic (20:80) extract of *Sonneratia apetala* leaves; t-test ^avs normal control, ^bvs EtOH control; *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001; % change in parenthesis

Discussion

The annual global average of alcohol consumption is 6.4 L per person older than 15⁽²³⁾. The World Health Organization estimates more than 2 billion people worldwide consume alcoholic beverages and nearly 76.3 million users having alcohol caused with problems⁽²⁴⁾. It has been reported that consumption of alcohol disrupts the gastrointestinal barrier either by activation of inflammation-associated transcriptional factors, such as nuclear factor-kappaB or by up regulation of iNOS or overproduction of NO⁽²⁵⁾. Experimental studies have also been confirmed that oxygen-generated free radicals and lipid peroxidation are involved in the pathogenesis of acute gastric lesions induced by alcohol⁽¹⁷⁾. It is therefore, well accepted hypothesis that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of gastric ulcers. Perhaps, there are also reports that antioxidants have played an important role in the protection of gastric mucosa against various necrotic agents⁽¹⁰⁾. Recent studies have shown that the antioxidant properties of herbs could be correlated with oxidative stress defence^(11,16). Plant polyphenols are antioxidants with redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers⁽²⁶⁾. Previous studies point out that mangroves have rich source of novel compounds along with providing new source of many already known biologically active compounds with antioxidant properties⁽¹³⁻¹⁵⁾. In the present study, hydro-methanolic extract of *Sonneratia apetala* leaves (SA) exhibited all major phytoconstituents like phenolics, flavonoids, triterpenoids, steroids and tannins. It has been recognized that phenolics and flavonoids play a substantial role in the treatment of gastric ulcers⁽²⁷⁾. Densitometric HPTLC fingerprint illustrated the presence of gallic acid, quercetin and coumarin in SA. There are also considerable pharmacological data to support that these three natural bioactive constituents have antioxidants, radical scavenging and antiulcer properties⁽¹⁶⁾.

Strong reducing capability and DPPH radical scavenging activity of SA demonstrate its antioxidant properties. Further, SA inhibited the formation of ABTS[•] radicals. The discoloration of ABTS[•] cation reflects the capacity of an antioxidant species to donate electrons or hydrogen atoms to deactivate harmful radicals⁽¹⁴⁾. SA also displayed nitric oxide and superoxide radical scavenging properties. iNOS and nitrotyrosine are considered to be key mediators in inflammation and oxidative stress pathways in relation with gastric ulcers⁽²⁵⁾. Moreover, it has been considered that hydroxyl radical scavenging capac-

ity is directly related to its antioxidant activity⁽¹⁴⁾. In the present study, SA also showed strong hydroxyl radical scavenging abilities. Therefore, it may be concluded that SA has the ability to scavenge free radicals. Other varieties of *Sonneratia* species and their different parts like bark, roots, fruits have also been reported for antioxidant potentialities, which corroborated the present findings^(2,4,6).

Reactive oxygen species (ROS), primarily super oxide anions, hydroxyl radicals and lipid peroxides are the harmful major contributors for gastric ulcer development, particularly in alcoholic states^(18,26). In this study, polyphenol rich SA showed potential preventive action in alcohol induced gastric mucosal damage in rats. Further, there are reports that unwarranted alcohol consumption created haemorrhagic injuries, extensive submucosal edema, mucosal frangibility and devastation to the epithelial cells of gastric tissue⁽²⁸⁾. To scavenge ROS, gastric cells have several enzymatic and non-enzymatic intracellular antioxidants including catalase, superoxide dismutase, glutathione and sulfhydryl groups, but excessive generation of ROS augments lipid peroxidation and depletes these antioxidants⁽²⁶⁾. But, in the present study, SA controls oxidative stress in gastric mucosal tissues as marked by reduced level of lipid peroxides and higher level of glutathione and catalase. Glutathione is one of the essential compounds for maintaining cell integrity because of its reducing properties and participation in the cell metabolism. Furthermore, catalase enzyme is a classical oxidative biomarker that exists mainly in peroxisomes of all aerobic cells and serves to protect the cells against damage from hydrogen peroxide^(10,28). Therefore, it assumed that hydro-methanolic extract of mangrove *Sonneratia apetala* leaves may lower the generation of ROS or nitric oxide radicals through its radical scavenging properties and thereby play a protective role in the prevention of mucosal haemorrhagic injuries by ethanol consumption.

Conclusion

From the above study it may conclude that *Sonneratia apetala* leaf has the capabilities to protect gastric ulcers caused by alcohol ingestion and that may be due to its strong radical scavenging abilities. Eventually, this study may lead to the development of effective compounds from *Sonneratia apetala* leaves for harmonizing therapeutic approaches to the treatment of complications in gastric ulcers, particularly in alcohol addicted population.

References

1. Spalding M, Kainuma M, Collins L. World atlas of mangroves. Earthscan: London, 2010.
2. Mandal RN, Naskar KR. Diversity and classification of Indian mangroves: a review. Trop Ecol. 2008; 49:131-146.
3. Wu SB, Wen Y, Li XW, Zhao Y, Zhao Z, Hu JF. Chemical constituents from the fruits of *Sonneratia caseolaris* and *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae). Biochem Syst Ecol. 2009; 37:1-5. Doi: 10.1016/j.bse.2009.01.002
4. Bandaranyake WM. Traditional and medicinal uses of mangroves. Mang Salt Marsh.1998; 2:133-148. Doi:10.1023/A:1009988607044
5. Charoenteeraboon J, Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Paechamud T. Hepatoprotective activity from various parts of *Sonneratia caseolaris*. Planta Med. 2007; 73:561-565.
6. Ali M, Muhit M, Goshwami D, Masud M, Begum B. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Sonneratia alba* barks. Int J Pharm Sci Res. 2012; 3:2233-2237. Doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.3(7).2233-37
7. Majumdar SG, Patra G. Chemical investigation of some mangrove species. Part VI. *Sonneratia apetala*. J Indian Chem Soc. 1979; 56:218.
8. Jiny VK, Belzik N, Nisha AR, Resiya S, Resmi S, Silvipriya KS. Pharmacognostical and phytochemical studies of a mangrove (*Sonneratia caseolaris*) from Kochi of Kerala state in India. J Pharm Res. 2010; 3:2625.

9. Sadhu S K, Ahmed F, Ohtsuki T, Ishibashi M. Flavonoids from *Sonneratia caseolaris*. J Nat Med. 2006; 60:264-265. Doi:10.1007/s11418-006-0029-3
10. Popovic M, Janicijevic HS, Kaurinovic B, Rasic J, Trivic S. Antioxidant effects of some drugs on ethanol-induced ulcers. Molecules. 2009; 14:816-826. Doi:10.3390/molecules14020816
11. Sumbul S, Ahmad A, Asif M, Akhtar M. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. J Pharm Bioallied Sci. 2011; 3:361-367. Doi:10.4103/0975-7406.84437
12. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. The National Academic Press: Washington DC., 2008.
13. Harbone JB, Phytochemical methods. 2nd ed., Chapman and Hall: London, 2002.
14. Sur TK, Hazra AK, Bhattacharyya D, Hazra A. Antiradical and antidiabetic properties of standardized extract of Sunderban mangrove *Rhizophora mucronata*. Pharmacog Res. 2015; 11:389-394. Doi:10.4103/0973-1296.153094
15. Banerjee D, Hazra AK, Seal T, Sur TK, Bhattacharyya D, Ray J, Mukherjee A, Mukherjee B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of different solvent extracts and isolated compounds of *Ipomoea pes-caprae* (L) sweet of Sunderban mangrove eco-complex. Asian J Chem. 2013; 25:4997-5000.
16. Sur TK, Hazra A, Hazra AK, Bhattacharyya D. Antioxidant and hepatoprotective properties of Indian Sunderban mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* L. leave. J Basic Clin Pharm. 2016; 7(3): 75-79. Doi: 10.4103/0976-0105.183262
17. Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. Japanese J Pharmacol. 1991; 57:495. Doi:10.1254/jjp.57.495
18. Sur TK, Pandit S, Bhattacharyya D, Debnath PK. Antiulcer activity of *Shankha Bhasma* (calcinated conch shell). Explor Anim Med Res. 2013; 3:48-56.
19. Mousa AM, El-Sammad NM, Hassan SK, Madboli AENA, Hashim AN, Moustafa ES, Bakry SM, Elsayed EA. Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. BMC Complement Altern Med. 2019 Dec 2;19(1):345. Doi:10.1186/s12906-019-2760-9.
20. Pandit S, Sur TK, Jana U, Bhattacharyya D, Debnath PK. Anti-ulcer effect of *Shankha Bhasma* in rats: a preliminary study. Indian J Pharmacol. 2000; 32:378-380.
21. Lyle N, Gomes A, Sur TK, Munsu S, Paul S, Chatterjee S, Bhattacharyya D. Possible role of antioxidant property of *Nardostachys jatamansi* in alleviation of chronic fatigue syndrome. Behav Brain Res. 2009; 202:285-290. Doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.005
22. Bhattacharyya D, Pandit S, Jana U, Sen S, Sur TK. Hepatoprotective activity of *Adhatoda vasica* aqueous leaf extract on D-galactosamine induced liver damage in rats. Fitoterapia. 2005; 76:223-225. DOI: 10.1016/j.fitote.2004.10.014
23. World Health Organization. Level of consumption. 2016. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/levels-of-consumption>
24. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. 2014. https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/
25. Tang Y, Forsyth CB, Farhadi A, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, Banan A, Fields JZ, Keshavarzian A. Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage. Alcohol Clin Exp Res. 2009; 33:220-232. Doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00842.
26. Hajrezaie M, Salehen N, Karimian H, Zahedifard M, Shams K, Batran RA. Biochanin a gastroprotective effects in ethanol-induced gastric mucosal ulceration in rats. PloS One. 2015; 10:e01215291. Doi: 10.1371/journal.pone.0121529.

27. Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Ferreira AL, Brito MS, Lima CA. Flavonoids with gastro-protective activity. *Molecules*. 2009; 14:979-1012. Doi:10.3390/molecules14030979.

28. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol*. 1994; 29:513-522. Doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a045580

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.21029

Artículos originales

Comparison of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* bioavailability results of different prednisone tablet formulations to assess the feasibility of possible biowaiver

Comparación de los resultados de biodisponibilidad *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de diferentes formulaciones de comprimidos de prednisona para evaluar la viabilidad de una posible bioexención

Leonardo Henrique Toehwé¹  0000-0002-1765-4356

Thiago da Silva Honorio²  0000-0002-3772-7225

Luiz Claudio Rodrigues Pereira da Silva³  0000-0002-6746-5756

Thalita Martins da Silva⁴  0000-0001-7685-3120

Luciana da Rocha Pitta⁴  0000-0002-2652-4182

Livia Deris Prado⁴  0000-0002-5691-9900

Lucio Mendes Cabral²  0000-0002-4550-5729

Helvécio Vinícius Antunes Rocha^{1,4}  0000-0002-9624-6405

¹Programa de Pós-graduação Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica. Farmanguinhos. Fiocruz. Rio de Janeiro. RJ. Brazil.

²Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, Departamento de Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. RJ. Brazil.

³Laboratório de Nanoteranósticos, Departamento de Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro. RJ. Brazil.

⁴Laboratório de Micro e Nanotecnologia. Farmanguinhos. Fiocruz. Rio de Janeiro. RJ. Brazil.

Correspondence

Helvécio V. A. Rocha

E-mail: helvecio.far@gmail.com

Recibido: 19.04.2021

Aceptado: 05.09.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

The authors declare no conflict of interest.

Resumen

Introducción: Los productos orales sólidos de liberación inmediata que contienen fármacos muy solubles y permeables son candidatos para el proceso de bioexención. Este trabajo tiene como objetivo comparar datos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* para establecer si las formulaciones de comprimidos orales de prednisona publicadas anteriormente son candidatas a la bioexención.

Método: Para lograr este objetivo se realizaron estudios de permeación en células Caco-2. Se aplicó un estudio de bioequivalencia previo entre la formulación de prueba y el medicamento de referencia en una evaluación *in silico* utilizando Gastroplus® para evaluar la bioequivalencia de otras dos formulaciones propuestas anteriormente.

Resultados: El coeficiente de permeabilidad aparente para prednisona presentó un valor de $3,69 \times 10^{-5}$ cm/s en 180 minutos. El estudio de bioequivalencia muestra que el producto probado y de referencia era equivalente. Las simulaciones *in silico* predijeron con éxito la farmacocinética de las formulaciones probadas y las otras dos, ya que fueron validadas con el estudio *in vivo*. Ambos exhiben los mismos perfiles de concentración plasmática frente a tiempo.

Conclusiones: A través de los resultados *in silico*, es posible inferir que las otras dos formulaciones ensayadas pueden ser bioequivalentes respecto al producto de referencia. Este resultado puede ser útil en la solicitud de bioexenciones. Para reducir los costos y el uso de seres humanos en los estudios de bioequivalencia, este enfoque podría ser una forma esencial de trabajar en la industria farmacéutica.

Palabras clave: prednisona; simulación *in silico*; biodisponibilidad; bioexención

Abstract

Introduction: The immediate-release solid oral products containing very soluble and permeable drugs are candidates for the biowaiver process. This work aims to compare *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* data to establish if previously published prednisone oral tablet formulations are biowaiver candidates.

Method: To achieve this goal, permeation studies were conducted on Caco-2 cells. A previous bioequivalence study between the test and the reference drug product was applied on an *in silico* evaluation using Gastroplus® to assess the bioequivalence of two other previously proposed formulations.

Results: The apparent permeability coefficient for prednisone presented a value of 3.69×10^{-5} cm/s in 180 minutes. The bioequivalence study shows that the tested and reference product was equivalent. The *in silico* simulations successfully predicted the pharmacokinetics of the tested and the other two formulations since they were validated with the *in vivo* study. Both exhibit the same plasma concentration vs. time profiles.

Conclusions: Through the *in silico* results, it is possible to infer that the other two formulations tested may be bioequivalent concerning the reference product. This result may be helpful in biowaiver requesting. Toward to reduce costs and the use of human beings in bioequivalence studies, this approach could be an essential way to work in the pharmaceutical industry.

Keywords: prednisone; *in silico* simulation; bioavailability; biowaiver

Highlights

In silico pharmacokinetic studies could accelerate the registration process for generic drugs applying for biowaiver.

As a biowaiver candidate, the relevance of *in silico* studies for BCS class I drugs is even more critical, given the regulatory scenario.

It may induce regulatory agencies to take a more in-depth view of the dissolution aspects during stability studies and how *in silico* previsions may help develop new projects.

Introduction

As in the USA and Europe, the generic drug registration in Brazil requires bioequivalence (BE) studies. Pharmaceutical equivalents drug products are considered bioequivalent and, therefore, interchangeable when the bioavailability is not statistically different between the products after administration at the same dose and under similar experimental conditions in a BE study⁽¹⁾.

Prednisone is a glucocorticoid extensively used in clinical practice for inflammatory diseases. It is considered borderline class I in the Biopharmaceutical Classification System (BCS), which is highly soluble and permeable. The drug has a plasma protein-binding rate of approximately 90%, bioavailability around 80%, and volume of distribution ranges from 0.4 to 1.0 L.kg⁻¹. It has a biological half-life time of about 3.6 hours, and maximum serum concentration (C_{max}) is reached between one and three hours after oral administration. The permeability rate of prednisone in artificial phospholipid membrane is 0.3×10^{-6} cm/s⁽²⁾.

In Brazil, prednisone is marketed as immediate-release oral tablets at concentrations of 20 mg and 50 mg. The reference medicine is named Meticorten®, produced by Merck Sharp & Dome®⁽³⁾. Numerous generic formulations of prednisone registered in the Brazilian market prove the BE with the reference product. These tests require resources and time in the formulation development process. Thus, one of the main discussions among the academic, industrial, and regulatory arena today revolves around biowaivers.

A biowaiver account that relative bioavailability or BE tests are not required for drug registration by the regulatory agency when a suitable *in vitro* assay could replace it⁽⁴⁾. The need for the pharmaceutical industry to obtain a safe tool that allows an *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) for a possible biowaiver is increasingly higher. The concept and application of this correlation have been focused attention on universities, pharmaceutical industries, and regulatory sectors.

The correlation of the *in silico* simulation with the *in vitro* and *in vivo* studies can predict the absorption, distribution, metabolism, and elimination of several drugs⁽⁵⁾. Biowaiver procedure could involve an evaluation through computational simulations that delineate a natural or laboratory process. For *in silico* simulation, some software such as SIMCYP™, PK-sim™, CLOEPK™, and GastroPlus® are currently used. However, to obtain a correlation, this software needs some active pharmaceutical ingredient (API) input data such as permeability rate, pKa, logP, logD, and solubility⁽⁶⁾.

Gastroplus® was used in a previous study to predict oral absorption and BE of two formulations of glyburide⁽⁷⁾. Also, the *in vitro* results combined with *in silico* simulation to justify a biowaiver for etoricoxib⁽⁸⁾. Even though it is handy in drug bioavailability prediction in the development phase, Brazilian legislation currently does not consider the *in silico* results to grant exemption or replace bioequivalence studies. On the other hand, the biowaiver could be required based on the Biopharmaceutical Classification System (BCS)^(4,9).

In a previous paper, we presented a pre-formulation study by which a prednisone raw material supplier was chosen. Tablet formulations were prepared, and a stability study was conducted to select which one should be scaled up. Moreover, we monitored dissolution and dissolution profiles during stability study, a not common approach in pharmaceutical literature. Considering the reduction of dissolution during stability studies, it could eventually impact the *in vivo* performance of the product over time⁽¹⁰⁾.

This work compared *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* data to establish if previously published prednisone oral tablet formulation is an effective candidate for the biowaiver process. Simultaneously, this paper brings a wholly new perspective of biowaiver attempt helping to understand this process better.

Methods

Permeation studies on Caco-2 cells

Cytotoxicity studies

Caco-2 cells (passage 57) were seeded in a 96-well plate, 32,000 cells/well, in a total volume of 200 microliters/well, using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, pH 7.40) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% benzylpenicillin (160 IU/ml) streptomycin sulfate (100 µg/ml) and 1 % of non-essential amino acids was used as the culture medium. Cell cultures were maintained at 37 °C, 95% air atmosphere, 5% CO₂, and 95% relative humidity^(11,12) as a culture medium. Subsequently, cell substrates were taken to the incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 24 hours for cell growth⁽¹³⁾. After 24 hours, the culture medium was removed from wells, and cells were placed in contact with a 31.5 µg/mL solution of prednisone in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) + 5% ethanol (pH 6.8). HBSS and HBSS + 5% ethanol solutions, both at pH 6.8, were used as control groups.

Samples were stayed connected with Caco-2 cells for 3 hours and then aspirated. Thus, the cells were treated with 2.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide solution (MTT solution in phosphate buffer solution - PBS, pH 7.4), adding 100 µL of HBSS (pH 6.8) and 25 µL of MTT solution per well. The plate was incubated for an additional 3 hours at 37 °C and 5% CO₂, MTT solution was aspirated, and the cells were washed with PBS (pH 7.4) two times. Then 100 µL/well of dimethylsulfoxide (DMSO) were added for formazan crystals solubilization, generating a violet coloration according to the degree of cellular viability. Absorbance readings from the wells were performed on Microplate Absorbance Reader (iMARKTM, USA), at 570 nm, using 690 nm as referencing, after vigorous shaking for 60 seconds^(14,15).

Caco-2 cells monolayer permeability studies

Samples were subjected to permeability tests through Caco-2 cell monolayers during passage 57. Cells were seeded onto polycarbonate filters (0.33 cm², 6.5 mm internal diameter, and 0.4 µm pores) in 24 well plates at a density of 2.5 x 10⁵ cells/cm². The cells' filters were maintained with cell culture medium changes for 21 days after seeding and were used for transepithelial electrical resistance and transport assays⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. The media used for API dilution was HBSS + 5% ethanol (pH = 6.8). This solution was used in the apical compartment (donor). HBSS (pH 7.4) mimics the microenvironment under the intestinal epithelium in the basolateral compartment (receptor). Prednisone solution at 31.5 µg/mL was prepared in HBSS + 5% ethanol (pH 6.8). Two hundred microliters of this solution were added into the apical compartment of the cell monolayer. At fixed times (30, 60, 120, and 180 minutes), each filter and its apical compartment were repositioned on a new well containing 600 µL of the fresh basolateral medium. All receptor solutions were collected and analysed directly (without dilution) by a UV spectrophotometer (λ = 239 nm). The apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated using Eq. (1).

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt/(A * 60 * C_0)} \quad (1)$$

Where dQ/dt is the permeability rate (amount of prednisone permeated per minute), A is the diffusion area of the cell monolayer, C₀ is the initial concentration of prednisone in the apical compartment⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. During the experiment, the integrity of the monolayer was evaluated by Transepithelial Electric Resistance (TEER) at fixed intervals (along with collection times) using the Millicell-ERS system (Millipore Corp., USA)^(14,15). Monolayer integrity was considered when voltages above 350 Ω.cm² were observed⁽¹¹⁾.

Bioequivalence study

The bioequivalence study between the 20 mg prednisone tablets produced by our group (biobatch P0020020910) and the reference drug product (Mantercorp® Pharmaceutical) was under the responsibility of the Nucleus of Bioequivalence and Clinical Trials (NuBEC) of the Federal University of São Paulo.

An open, randomized, cross-over study was conducted with two treatments, two sequences, and two periods, in which volunteers received, in each period, the test or the reference formulation. An amount of 26 healthy volunteers, men and women aged between 18 and 50 years, and body mass index ≥ 19 and ≤ 28.5 kg.m⁻² receive one tablet containing 20 mg prednisone fasted orally, uniquely with 200 mL of non-gas mineral water. The confinement period was 24 hours. Blood samples for determination of plasma concentration of prednisolone were collected before administration and up to 24 hours later at pre-established intervals. Plasma concentrations of prednisolone were determined by HPLC-MS⁽¹⁷⁾.

In silico model absorption for prednisone immediate-release tablet

The *in silico* absorption model was developed using the software GastroPlus® (Version 9.5, Simulation Plus Inc., USA). The model was built with the integration between the Advanced Compartmental Absorption and Transit (ACAT) and pharmacokinetic (PK) model (1, 2, and 3-compartment model). The ACAT model describes the gastrointestinal tract like compartments considering drug (unreleased drug, dissolved drug, precipitated drug) and physiology (luminal volume, pH, transit time) characteristics. Once integrated into the PK information, like distribution volume, clearance, and half-life time, it is possible to observe the simulated drug kinetic absorption and exposition in the gastrointestinal tract.

The software has three main input modules: compound, physiology, and pharmacokinetics. The physicochemical (solubility, permeability, pKa) and drug dosage form (tablet, dose, particle size) properties were inputted at the compound module. These data were taken from the literature or experimentally determined (**Table 1**). The effective gastrointestinal permeability (P_{eff}) of prednisone (biobatch P0020020910) was predicted based on the conversion of the apparent permeability (P_{app}) with Caco-2 cells using a built-in correlation of the GastroPlus®. The solubility data was determined in pH 1.2, 5.5, and 6.8 aqueous media^(8,18,19).

Table 1. Input parameters used for the prednisone IR tablet absorption model.

| Parameters | Value | Reference |
|--|-----------|--|
| Molar mass (g/mol) | 358.43 | (ANVISA, 2019) |
| Log P | 1.46 | (Paixão, Gouveia, & Morais, 2012; Vogt <i>et al.</i> , 2007) |
| Dose (mg) | 20 | BE |
| Dosage form | Tablet IR | E |
| Dose volume (mL) | 200 | BE |
| Solubility (mg/mL) | | |
| pH 1.2 | 4.48 | (Toehwé <i>et al.</i> , 2017) |
| pH 5.5 | 4.53 | |
| pH 6.8 | 4.55 | |
| P_{app} in Caco-2 (cm/s x 10 ⁻⁵) | 3.69 | E |
| Mean precipitation time (s) | 900 s | DV |
| Drug particle radius (g/ml) | 1.2 | DV |

| Parameters | Value | Reference |
|----------------------------|----------|-----------|
| Particle radius (µm) | 25 | DV |
| Physiology | Fasted | E |
| AFS (Model) | SA/V 6.1 | DV |
| Body mass (kg) | 66.4 | BE |
| Blood/Plasma ratio | 1.0 | E |
| Distribution volume (L/kg) | 0.69 | E |
| Clearance (L/h) | 11,51 | E |
| t _{1/2} (h) | 2.86 | E |
| Simulation Time (h) | 24 | E |

P_{app} = apparent permeability coefficient; BE = bioequivalence study; E = experimental; DV = GastroPlus® default value

In the physiology module, the Opt logD Model SA/V 6.1 estimates the GI tract permeability. The absorption gradient coefficient C1-C4 was used to calculate the absorption scale factors (ASF) and scale the effective permeability to account for absorption rate variations that differ from one compartment to another^(18,20).

In the pharmacokinetic module, the used data were obtained from the bioequivalence study of the bio-batch P0020020910, as described above (item 2.3)^(10,17). The *in vivo* plasma concentration versus time data was loaded into the PKPlus™ module (integrated module of GastroPlus®) and evaluated by the software according to non-compartmental, 1-, 2-, and 3-compartment PK models. The best model parameters were then imported into the pharmacokinetic module to enable the *in silico* plasma concentration versus time data^(8,18,21). To develop the prednisone absorption model, the “IR tablet mode” was selected in the compound module that refers to immediate-release tablets^(20,21). Through Eq. (2) it was calculated the percent prediction error (%PE) to compare observed and simulated PK parameters⁽¹⁹⁾.

$$\%PE = 100 * \left| \frac{(\text{observed} - \text{predicted})}{\text{observed}} \right| \quad (2)$$

Results

Permeation studies on Caco-2 cells

Cytotoxicity and Caco-2 cells monolayer permeability studies

The cytotoxicity assessment was performed to determine whether concentrations of 31.5 µg/mL of API and HBSS pH 6.8 + 5% ethanol medium used in the Caco-2 cell permeability test would harm the cells. The cell viability was almost 100% for all evaluated media (data not shown), so no cytotoxic effect was observed among the tested samples.

After 21 days of culture, the mean transepithelial resistance (TEER) of the Caco-2 cell monolayer was 711.2 ± 37.05 Ω.cm². **Figure 1** presents the permeation data of prednisone and the mean TEER (Ω) as a function of time. At 180 minutes, prednisone permeation reached 65.84% of the initial mass (6.3 µg) deposited in the apical compartment.

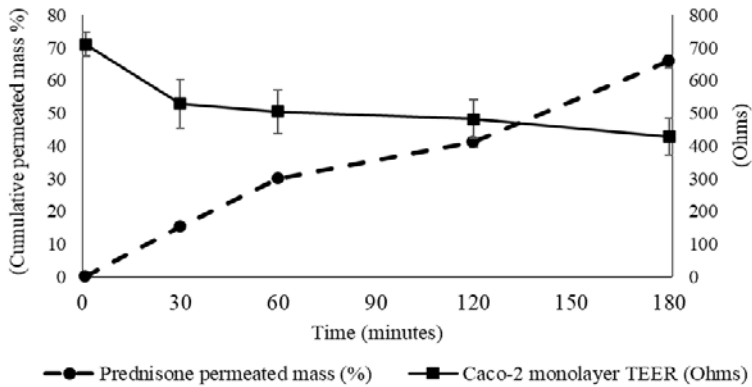


Figure 1. Cumulative permeated mass (%) of prednisone across Caco-2 monolayer and TEER values (Ohms) after 180 minutes.

The apparent permeability coefficient (P_{app}) for prednisone was calculated from the mean of 5 determinations of the permeability test and presented a value of 3.69×10^{-5} cm/s in the accumulated time of 180 minutes. It should be observed that this value of P_{app} was used in the simulation of bioavailability by GastroPlus®.

Bioequivalence studies

The mean plasma concentration vs. time curve of prednisolone (active prednisone metabolite) in volunteers using the biobatch P0020020910 and reference drug product (R023) is shown in **Figure 2**. The pharmacokinetic parameters analyzed in the study are described in **Table 2**.

Table 2. Pharmacokinetic parameters obtained from the mean plasma concentration *versus* prednisolone time curve.

| Parameters | P0020020910 | | | | R023 | | | |
|-------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| | Average | SD | Mini | Maxi | Average | SD | Mini | Maxi |
| AUC _{0-t} (ng.h/mL) | 563.22 | 120.70 | 365.38 | 972.94 | 598.02 | 186.89 | 365.33 | 1208.02 |
| AUC _{0-inf} (ng.h/mL) | 598.50 | 127.27 | 380.56 | 985.52 | 628.25 | 187.50 | 379.12 | 1222.93 |
| C _{max} (median/range) (h) | 126.08 | 27.36 | 78.36 | 197.49 | 131.65 | 31.52 | 101.14 | 247.72 |
| T _{max} (median/range) (h) | 1.52 | 0.86 | 0.75 | 4.00 | 1.56 | 0.78 | 0.50 | 3.00 |
| K _{el} (L/h) | 0.25 | 0.05 | 0.15 | 0.33 | 0.26 | 0.04 | 0.14 | 0.37 |
| t _{1/2} (median/amp) (h) | 2.82 | 0.56 | 2.07 | 4.49 | 2.77 | 0.59 | 1.86 | 4.92 |

SD = standard deviation; Mini = minimum; Maxi = maximum

According to the estimated geometric means ratio between C_{max} and the AUC_{0-t} for batches P0020020910, and R023 the results obtained for these parameters were 104.24% (99.12%, 109.62%) and 100.60% (96.59%, 104.78%), respectively, considering a 90% confidence interval. These results compile with the range established by the Guide for tests of relative bioavailability/bioequivalence of medicines⁽²²⁾. Therefore, the formulations under study are bioequivalent⁽¹⁷⁾.

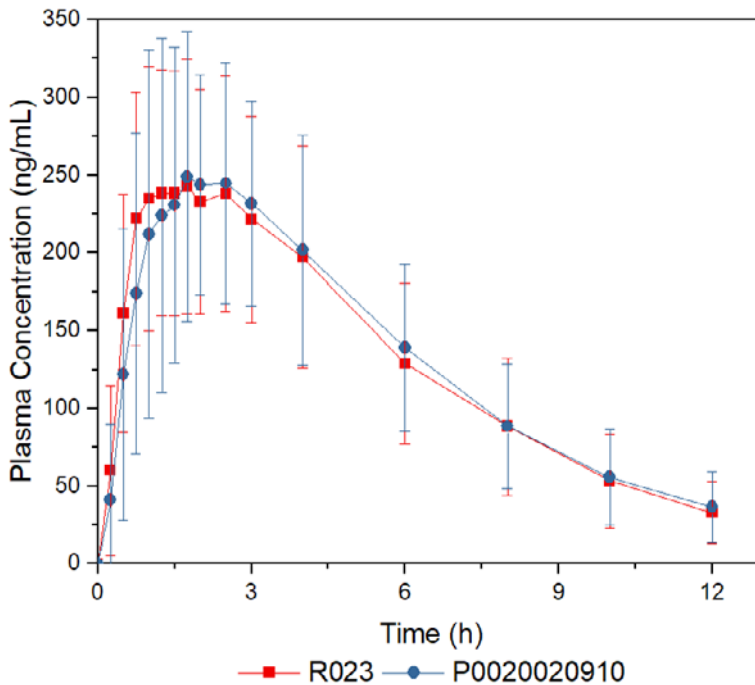


Figure 2. Mean plasma concentration of prednisolone versus time in volunteers following a single dose administration of prednisone 20 mg tablets of biobatches P0020020910 and R023.

In silico absorption model for prednisone immediate-release tablet

The absorption model was developed for prednisone (biobatch P0020020910) immediate-release tablet. The fraction of the amount of drug absorbed was 96.4%. **Table 3** presents the prednisone simulated compartmental absorption along to the GI tract. According to the ACAT model, this simulation confirmed the high absorption in the proximal region (~93,7%).

The simulated and experimental PK parameters after oral administration of 20 mg prednisone immediate-release tablets (biobatch P0020020910) are presented in **Table 4**. The predicted outputs and bio-availability *in vivo* were almost similar. The predicted errors were lower than 10% for all parameters, except for $t_{1/2}$ in the reference product.

GastroPlus® was used to simulate plasma concentration-time curves for all the products (R023, P0020020910, MEST01, and MEST 02). The resulting profiles were then compared to the reference product (R023) curve plotted with *in vivo* experimental values to evaluate the proposed formulations' *in vivo* performance (**Figure 3**). According to the predicted plasma concentration-time curves, the biobatch P0020020910 show an *in vivo* performance equivalent to the reference product, as proven by the BE studies (**Figure 2**). Furthermore, the MEST01 and MEST02 formulations would show equally *in vivo* performance compared to the reference product.

Table 3. Simulation of the percentage absorbed of prednisone (biobatch P0020020910) along with the compartments of the gastrointestinal tract.

| Compartments | Prednisone (%) |
|-----------------|----------------|
| Stomach | 0 |
| Duodenum | 45.8 |
| Jejunum 1 | 37.7 |
| Jejunum 2 | 10.2 |
| Ileum 1 | 3.1 |
| Ileum 2 | 1.0 |
| Ileum 3 | 0.4 |
| Caecum | 1.3 |
| Ascending colon | 0.4 |
| Total | 96.4 |

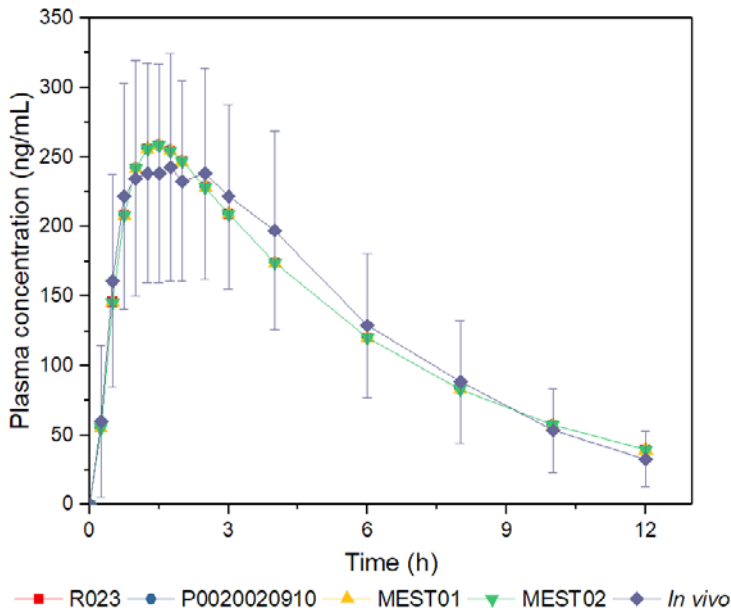


Figure 3. Plasma concentration vs. time curve of the reference product (R023) based on *in vivo* experimental values and of products P0020020910, MEST01, and MEST 02 created using simulated values given by GastroPlus® based on *in vitro* dissolution data⁽³²⁾. The error bars represent the standard deviation for the reference plot.

Discussion

Permeation studies on Caco-2 cells

MTT test demonstrated that both drugs and media did not cause cell damage since its viability at the end of the experiment was around 100%. This result follows Yamashita and co-workers, which conclud-

ed that ethanol up to 5% (v/v) does not cause significant permeability and transepithelial resistance (TEER). The results also show that HBSS (pH 6.8) and HBSS + 5% ethanol (pH 6.8) media are not altering cell viability, as expected⁽²³⁾.

TEER values were compatible with those reported in the literature for mature monolayers^(12,15). In **Figure 1**, it is possible to observe that the most significant permeate fraction occurred in the interval between 120 and 180 minutes and that TERR remained above 350 Ω , confirming that monolayer cells remained intact throughout the experiment⁽¹¹⁾.

As stated by the literature, drugs that show absorption between 70% and 100% should have P_{app} greater than 10.0×10^{-6} cm/s⁽²⁴⁾. A study that evaluated the correlation between biopharmaceutics classification system (BCS) and P_{app} value (cm/s) argued that drugs with P_{app} greater than 9.75×10^{-6} cm/s show a high, and less than 5.00×10^{-6} cm/s, a low permeability. As previously mentioned, prednisone belongs to BCS class I. The P_{app} obtained in this study for this drug (3.69×10^{-5} cm/s) corroborates with BCS classification⁽²⁵⁾.

According to Vogt and collaborators⁽²⁾, there are very limited studies reporting the *in vitro* permeability of prednisone since it is a prodrug. However, the FDA Guidance⁽¹⁾ states that the prodrug permeability should be measured when the conversion occurs after GI membrane permeation. So, the results about Caco-2 cells prednisone permeability could be beneficial in a biowaiver decision.

***In silico* absorption model for prednisone immediate-release tablet**

According to the drug solubility of previous studies and permeability analyzed in this work, prednisone is highly soluble and absorbed in the intestinal tract. These characteristics added to an immediate-release dosage form shown a dissolution profile of $\geq 85\%$ in 15 minutes⁽¹⁰⁾, suggesting, like other class I drugs, that the prednisone can be highly absorbed in the proximal region of the intestine^(21,26).

The evaluation of the *in vivo* plasma concentration vs. time curve by GastroPlus[®] present that prednisone kinetics follow a one-compartmental model. It means that the drug promptly occupies the central compartment, and the plasma concentration decrease depends only on the elimination rate constant, which follows a first-order process^(27,28).

The predicted outputs and BA *in vivo* (**Table 4**) suggest that the *in silico* absorption model based on the **Table 1** data successfully simulate the *in vivo* bioavailability of prednisone IR tablets. The lower %PE values prove that the model could mimic the *in vivo* PK parameters. Duque and co-workers successfully used the ACAT model in BA simulated of fluconazole, a BCS class I drug, showing that the prediction model was also valuable for generic and reference drugs⁽²¹⁾. Also, this absorption model was widely applied in BCS class II drugs^(18,20).

As mentioned, the biowaiver is requested for BCS class I drugs when using immediate-release tablets. In this context, a predictive *in vitro* dissolution could replace the bioequivalence study⁽²⁹⁾. Once the *in silico* absorption model was developed for prednisone IR tablets, it becomes possible that the bioavailability simulation helps during the optimization of the formulation process. By evaluating the *in vivo* and *in silico* data, it is possible to infer that an *in vivo* study is probably unnecessary for these, suggesting the bioequivalence between the MEST 01, MEST 02, R023, and biobatch P002002910.

Table 4. Pharmacokinetic parameters obtained in the *in vivo* study and simulated by GastroPlus[®] for biobatch P002002910 and reference product R023.

| Parameters | Simulated | R023 | %PE | P002002910 | %PE |
|-------------------------|-----------|--------|--------|------------|--------|
| C_{max} (ng/mL) | 318.9 | 298 | -7.01% | 313 | -1.88% |
| T_{max} (h) | 1.36 | 1.17 | 16.2% | 1.50 | 9.33% |
| ASC_{0-t} (ng.h/mL) | 1730.5 | 1685.7 | 2.65% | 1718.5 | -0.69% |
| ASC_{0-inf} (ng.h/mL) | 1737.1 | 1769.6 | 1.83% | 1811.6 | 4.11% |

%PE = percent prediction error

The Brazilian regulatory agency recommendations for the waiver of BE studies according to the BCS state that IR solid oral products must have rapid drug dissolution (> 85% in 30 min) in 0.1 HCl, pH 4.5, and pH 6.8⁽⁴⁾. Previously, the dissolution tests were conducted in purified water, as recommended by the Brazilian compendia⁽¹⁰⁾. All the products that meet the requirements of the dissolution rate still showed an *in silico* performance equivalent to the reference product. The very rapid dissolution (85% in up to 15 minutes) of the tested prednisone tablets makes the gastric emptying rate the limiting factor for *in vivo* drug absorption, and no more the dissolution rate⁽³⁰⁾. In some cases, the *in vitro* dissolution method was not discriminative for the *in vivo* process. Al-Tabakha and co-workers evaluated different products containing amoxicillin and potassium clavulanate that was considered bioequivalent but presenting differently *in vitro* dissolution profiles⁽³¹⁾.

On the other hand, to declare that the tested formulations are bioequivalent to the reference product, more predictive dissolution studies will be necessary to discriminate the formulation's performance. The use of purified water as dissolution media, although recommended for quality control tests⁽¹⁰⁾, may not be adequate for evaluating pharmaceutical equivalence.

Although the results present by this study provide a biowaiver favorable data based on the *in silico* pharmacokinetic study and the BCS, prednisone is at the borderline of the current criteria of BCS class I. The biowaiver of prednisone must be carefully evaluated considering its indication, therapeutic index, pharmacokinetic performance, and the possibility of drug-excipients interaction⁽²⁾. Due to many marked generic products of prednisone and other class I drugs, the use of different formulation excipients could modify their dissolution and oral absorption. Therefore, *in vivo* bioequivalence studies are still needed.

Conclusion

The present study evaluates the *in silico* bioavailability simulations comparing these data with *in vivo* ones in order to establish if previous published prednisone oral tablet formulation is a valid candidate for the biowaiver process. The *in silico* bioavailability performed for prednisone in the GastroPlus® software was successful since the predicted PK parameters were similar to *in vivo* data. The simulated plasma concentration vs. time curve based on the previous dissolution data allows us to infer that the proposed formulations MEST01 and MEST02 could be bioequivalent with the reference product. In order to confirm this hypothesis, a predictive dissolution study should be applied.

This work turns available the bioavailability profile obtained in human volunteers and compares reference and tests drug products, which is not common in the offered publications. More than that, it presents a viable *in silico* model to simplify post-approval changes in the regulatory scenario. Prednisone is classified as a BCS class I or borderline class I drug and a promising candidate for biowaiver. However, a careful evaluation of the excipients used is necessary to claim it. Toward to reduce costs and the use of human beings in bioequivalence studies, this approach could be an essential way to work in the pharmaceutical industry.

References

1. FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs—General Considerations. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2014.
2. Vogt M, Derendorf H, Kramer J, Junginger HE, Midha KK, Shah S, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: prednisone. *J Pharm Sci.* 2007;96(6):1480–9.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos de referência. Brasília, DF; 2020 p. 54.

4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 37, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. 2011 p. Diário Oficial da União 05 ago 2011, nº 150, Seção.
5. Storpirtis, S.Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. Ciências farmacêuticas: biofarmacotécnica. Rio de Janeiro, Brazil: Guanabra Koogan; 2009. 250 p.
6. Waterbeend H V., Testa B. Bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability. Dusseldorf: Wiley-UCH; 2009. 517 p.
7. Wei H, Löbenberg R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. Eur J Pharm Sci. 2006;29(1):45–52. doi: 10.1016/j.ejps.2006.05.004
8. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Computer simulations using GastroPlus® to justify a bio waiver for etoricoxib solid oral drug products. Eur J Pharm Biopharm. 2009;72(1):91–8. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.10.019
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n. 2, de 14 de março de 2013. Determina a publicação da lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica. 2013 p. Diário Oficial da União 15 mar 2013, nº 51.
10. Toehwé LH, Prado LD, Rocha HVA. Prednisone raw material characterization and formulation development. Braz J Pharm Sci. 2018;53(4):1–14. doi: 10.1590/s2175-97902017000400088
11. Annaert P, Gelder J V., Naesems L, De Clercq E, Mooter V, Kinget R, et al. Carrier mechanisms involved in the transepithelial transport of bis(POM)-PMEA and its metabolites across Caco-2 monolayers. Pharm Res. 1998;15:1168–73.
12. da Silva LC, Garcia, Mori, Sandri, Bonferoni, Finotelli, et al. Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity. Int J Nanomedicine. 2012;7:2975. doi: 10.2147/IJN.S31632
13. Konsoula R, Barile FA. Correlation of *in vitro* cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. Toxicol *In vitro*. 2005;19(5):675–84. doi: 10.1016/j.tiv.2005.03.006
14. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Boselli C, Caramella C. Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: *In vitro* (Caco-2 Model) and Ex Vivo (Excised Rat Jejunum, Duodenum, and Ileum) Evaluation of Penetration Enhancement Properties. AAPS PharmSciTech. 2010;11(1):362–71.
15. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Gibin S, Zambito Y, et al. Nanoparticles based on N-trimethylchitosan: Evaluation of absorption properties using *in vitro* (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. Eur J Pharm Biopharm. 2007;65(1):68–77. doi: 10.1016/j.ejpb.2006.07.016
16. Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. *In vitro* trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. Drug Discov Today. 2003;8(21):997–1003. doi: 10.1016/S1359-6446(03)02873-3
17. Nucleo de Bioequivalência e Ensaios Clínicos. Universidade Federal de São Paulo. Relatório final do estudo de biodisponibilidade relativa de prednisona 20 mg. São Paulo; 2011.
18. Honório T da S, Pinto EC, Rocha HVA, Esteves VSD, dos Santos TC, Castro HCR, et al. *In vitro–In vivo* Correlation of Efavirenz Tablets Using GastroPlus®. AAPS PharmSciTech. 2013;14(3):1244–54. doi: 10.1208/s12249-013-0016-4
19. Simulation Plus. GastroPlus® 9.1 User Manual. Lancaster, California; 2017. p. 696.
20. Grbic S, Parojcic J, Ibrić S, Djurić Z. *In vitro–In vivo* Correlation for Gliclazide Immediate-Release Tablets Based on Mechanistic Absorption Simulation. AAPS PharmSciTech. 2011;12(1):165–71. doi: 10.1208/s12249-010-9573-y
21. Duque MD, Silva DA, Issa MG, Porta V, Löbenberg R, Ferraz HG. *In silico* Prediction of Plasma Concentrations of Fluconazole Capsules with Different Dissolution Profiles and Bioequivalence Study Using Population Simulation. Pharmaceutics. 2019;11(5):215. doi: 10.3390/pharmaceutics11050215

22. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE n. 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do Guia para Provas de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência de Medicamentos. Brasília, DF; 2006 p. 8.
23. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2000;10(3):195–204. doi: 10.1016/S0928-0987(00)00076-2
24. Lam KW, Xu J, Ng KM, Wibowo C, Lin G, Luo KQ. Pharmaceutical Salt Formation Guided by Phase Diagrams. *Ind Eng Chem Res.* 2010;49(24):12503–12. doi: 10.1021/ie902080k
25. Bock U, Kottke T, Gindorf C, Haltner E. Validation of the Caco-2 cell monolayer system for determining the permeability of drug substances according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS). *Across Barriers.* Saarbrücken; 2003. 1–7 p.
26. Tubic-Grozdanic M, Bolger MB, Langguth P. Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds. *AAPS J.* 2008;10(1):213–26.
27. Rosembaum S. Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations. In: Rosembaum S, editor. *Compartmental Models in Pharmacokinetics.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2017. p. 145–57.
28. Tozer TN, Rowland M. Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica. In: Tozer TN, Rowland M, editors. *Farmacocinética e Farmacodinâmica.* Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 2–25.
29. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for Industry to Dissolution Testing for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.* U.S. Government Printing Office: Washington, DC; 1997.
30. Emami J. *In vitro-in vivo* correlation: From theory to applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2006;9(2):31–51.
31. Al-Tabakha M, Fehelbom K, Obaid DEE, Sayed S. Quality Attributes and *In vitro* Bioequivalence of Different Brands of Amoxicillin Trihydrate Tablets. *Pharmaceutics.* 2017;9(4):18.

doi: 10.30827/ars.v62i4.21442

Artículos originales

La farmacéutica Milagro Almenara Pérez, del olvido a su reconocimiento

The pharmacist Milagro Almenara Pérez, from
oblivion to her recognition

Juan Núñez-Valdés¹  0000-0002-8413-6735

Antonio Ramos Carrillo²  0000-0002-4665-4646

¹Universidad de Sevilla. Facultad de Matemáticas, Departamento de Geometría y Topología, Sevilla, España.

²Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Sevilla, España.

Correspondencia

Juan Núñez Valdés
jvaldes@us.es

Recibido: 02.06.2021

Aceptado: 06.07.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

No ha habido ninguna relación económica ni de cualquier otra naturaleza que haya influido en la preparación de este manuscrito para su publicación.

Resumen

Introducción: Milagro Almenara Pérez se licenció en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada en 1921. Sin embargo, tras la Guerra Civil, parece que ella nunca existió, y no solo su persona, sino también su expediente universitario e incluso la farmacia de Granada en la que trabajó. En este artículo se muestra una breve biografía suya, con el doble objetivo de ponerla como referente ante la sociedad y también de ilustrar las muchas similitudes existentes entre su vida y la del conocido poeta granadino Federico García Lorca.

Método: Búsqueda de información sobre Milagro Almenara Pérez en fuentes archivísticas, bibliográficas, digitales e incluso periodísticas, que ha permitido completar con datos nuevos y recientes algunos aspectos biográficos que no se encuentran en los no muy abundantes trabajos de investigación ya publicados sobre ella.

Resultados: Como resultado del estudio realizado se han añadido datos originales recientes a la biografía de Milagro Almenara Pérez y se justifica la hipótesis de la existencia de una determinada similitud entre su vida y la del poeta andaluz Federico García Lorca.

Conclusiones: Durante la Guerra Civil Española se destruyeron, por parte de ambos bandos, muchos documentos, tanto personales como institucionales, que atañían a aquellas personas a las que cada bando consideraba desafectas. Entre ellas, la farmacéutica Milagro Almenara, cuya vida presenta muchas coincidencias con la del poeta Federico García Lorca.

Palabras clave: mujeres farmacéuticas pioneras españolas; Milagro Almenara Pérez; Federico García Lorca; consecuencias de la Guerra Civil española.

Abstract

Introduction: Milagro Almenara Pérez graduated from the Faculty of Pharmacy of the University of Granada in 1921. However, after the Civil War, it seems that she never existed, and not only her person, but also her university record and even the Granada pharmacy where she worked. This article shows a biography of her, with the double objective of showing her as a reference to society and also to illustrate the strong parallelism between her life and that of the well-known Granada poet, Federico García Lorca.

Method: A search for information on Milagro Almenara Pérez has been carried out in archival, bibliographic, digital and even journalistic sources that has made possible to complete with new and recent data some biographical aspects that are not found in the few research works already published on her.

Results: As a result of the study, original data have been added to the biography of Milagro Almenara Pérez and the hypothesis of the existence of a certain similarity between her life and that of the famous Andalusian poet Federico García Lorca is justified.

Conclusions: In the Spanish Civil War many documents, both personal and institutional, were destroyed by both sides, which concerned those people whom each side considered disaffected. Among them, the pharmacist Milagro Almenara, whose life had many coincidences with that of the poet Federico García Lorca.

Keywords: Spanish pioneering pharmaceutical women; Milagro Almenara Pérez; Federico García Lorca; consequences of Spanish Civil War.

Puntos clave

En este artículo se muestra la biografía de Milagro Almenara Pérez, una de las mujeres pioneras de los estudios farmacéuticos en España, y se ponen de manifiesto recientes actividades realizadas por diferentes entidades, entre ellas la Universidad de Granada, para rehabilitar su figura, olvidada durante muchos años por efectos de la Guerra Civil. Con ello se contribuye al desarrollo de la Historia de la Farmacia y se aporta una nueva biografía a los estudios sobre la mujer.

Introducción

La vida de la farmacéutica Milagro Almenara Pérez no está exenta de un gran misterio y de una cierta controversia. Ciertamente, es como si ella nunca hubiera existido (de hecho, Martín, López y Cabezas no pudieron encontrar en la Universidad ninguna documentación oficial sobre ella que pudieran incluir en su muy completo trabajo sobre las mujeres que estudiaron Farmacia en Granada entre 1850 y 1950⁽¹⁾). Y no solamente ocurre esto con su persona, sino también con la farmacia de Granada en la que trabajó y con otros documentos personales. La orla de su promoción desapareció inexplicablemente del archivo fotográfico de la Universidad de Granada, al igual que su expediente, aunque afortunadamente este último ha sido encontrado hace poco en el Archivo Histórico de esa Universidad, repartido entre tres carpetas sin relevancia.

Todo esto ha hecho que la figura de Milagro Almenara sea prácticamente olvidada para la sociedad, a diferencia de la del poeta Federico García Lorca, quien es conocido por todos gracias a la excelencia de su obra literaria y que comparte con ella una gran similitud en su vida. Por ser García Lorca tan popular no entramos en su biografía en este trabajo, dadas las ya muy completas contribuciones existentes⁽²⁾ y la gran cantidad de libros sobre su obra que pueden encontrarse en la literatura.

El objetivo principal de este artículo es rescatar la figura de Milagro Almenara y presentarla como referente ante la sociedad, al haber sido capaz de estudiar en una época en la que los estudios universitarios estaban vedados para las mujeres, ser la primera mujer granadina que se licenció en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, la cuarta en hacerlo en esa disciplina en esa Universidad y la primera en tener una farmacia tanto en Granada como previamente en un pequeño pueblo granadino, La Rábita. Para ello hemos tratado de completar con nuevos y recientes datos algunas de las escasas biografías existentes sobre su vida, en particular las excelentes colaboraciones del periodista Gabriel Pozo Felguera, en “El Independiente” de Granada^(3,4,5), en 2017, que permitieron sacar a la luz su figura y hacer que Milagro Almenara fuese un poco más conocida.

Otro objetivo, aunque de menor entidad, es enfatizar el hecho de la existencia de muchos episodios muy similares en las vidas de Milagro Almenara y Federico García Lorca, que las hacen ser muy parecidas, a pesar de las también enormes diferencias de todo tipo, género, estudios realizados, aficiones, fama que alcanzaron, etc, que también las diferencian.

Métodos

Metodológicamente, se ha realizado una exhaustiva búsqueda de información sobre la farmacéutica Milagro Almenara Pérez en todo tipo de fuentes y se han destacado aquellos aspectos de su vida que resultan muy similares a otros existentes en la vida del poeta granadino Federico García Lorca.

Resultados: biografía de Milagro Almenara Pérez

En esta sección se muestra la biografía de Milagro Almenara desglosándola en los distintos apartados que jalonaron su vida.

Cuando murió su esposa en 1911, Salvador y Brígida contrajeron matrimonio en 1912, aunque Salvador no reconoció a Milagro como hija suya. Salvador falleció en 1917, dejándole una sexta parte en su testamento a Milagro, aunque sin reconocerla tampoco como hija suya en ese documento⁽⁵⁾.

En 1916, con 16 años, Milagro obtuvo el título de bachiller con el segundo mejor expediente del Instituto y ese mismo año se matriculó en la Facultad de Farmacia de Granada (era la única mujer de su curso). Fue el número uno de su promoción 1916-1921. Sacó premio extraordinario en las trece asignaturas. Superó sobradamente el examen de grado sobre “Rubiáceas y valerianáceas” y en febrero de 1922 le fue extendido su título con premio extraordinario. Fue la cuarta mujer licenciada en Farmacia en la Universidad de Granada, tras Gertrudis Martínez Otero en 1896 (tercera mujer española nacida en la península en licenciarse en Farmacia, después de María Dolores Martínez Rodríguez, en 1893 y María Blanca de Lucía Ortiz, en 1896⁽⁶⁾) y algunos años después Antonia Sánchez Peñuela y Juana Álvarez Bañón, ambas en 1918.

Sus trabajos como farmacéutica

Tras ingresar en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Granada el 2 de diciembre de 1926, Milagro abrió su primera farmacia en La Rábida (Granada), aunque solo estuvo allí dos años.

Ocho años después, ya en Granada, Milagro presentó el 3 de julio de 1936 una instancia al Ayuntamiento solicitando licencia para poner a su nombre la “Farmacia Compañía - Dr. Pontes-Guardiola” (Figura 2), situada en la calle Cobertizo de la Botica, nº 1.



Figura 2. La Farmacia de la Compañía en tiempos de Milagro. Fuente: Pozo⁽⁴⁾

Su actividad política

Su entrada en la política se produjo durante los dos últimos años de su carrera, con motivo de unas protestas callejeras sociales en febrero de 1936, a las que se sumaron los estudiantes universitarios uniéndose a una manifestación en contra de las autoridades gubernativas locales, manifestación fuertemente reprimida por los guardias, que dejó 3 muertos y varios heridos. Así se bautizó en la política quien en sus últimos años, ya licenciada, fue llamada “la boticaria roja”⁽⁷⁾.

Milagro entró entonces en política como delegada de la Juventud Universitaria Femenina, asociación sufragista y en pro de los derechos de la mujer en España, que trataba de captar a estudiantes, licenciadas y doctoras para formar y liberar al sexo femenino. A pesar de su juventud, Milagro coordinó un

grupo que se relacionaba con ilustres socialistas de la época, como el catedrático Fernando de los Ríos, ganador en 1919 de las elecciones por el Partido Socialista y diputado nacional, Eudoxia Píriz y Elisa Soriano. De esa forma y a partir de entonces, Milagro tuvo un papel destacado en la política como feminista (fue propulsora del movimiento sufragista femenino 1931-33), activista de izquierdas y también perteneciente a una logia masónica (en la calle Elvira), aspectos después determinantes para su final.

Sus últimos meses de vida y el olvido de su figura

Milagro no pasó mucho tiempo en su farmacia. El Alzamiento en Granada (20/07/1936) produjo que su farmacia fuese intervenida, al no disponer los sublevados de industria farmacéutica y necesitar el envío de medicamentos a los frentes de guerra.

Por ello, la farmacia de Milagro permaneció abierta hasta casi mes después, cuando un piquete de guardias de asalto se presentó en la farmacia con una orden de detención hacia ella del Gobierno Civil, y la condujo a la cárcel. Allí coincidió con Rosario Fregenal, una modista apodada “la Fregenala”, también republicana, liberal y feminista. El 2 de noviembre de 1936, las dos fueron llevadas al frente de Víznar, donde las fusilaron⁽⁷⁾.

Posteriormente, su farmacia fue comprada por los actuales laboratorios GSK y tras la compra, los propietarios embalaron todos los materiales y se los llevaron a Londres, donde reprodujeron la antigua farmacia, que estuvo expuesta hasta la década de los setenta del siglo pasado, estando actualmente embalada en cajas repartidas por la Collection Trust y The Science Museum (Figura 3)⁽³⁾.



Figura 3. Interior de la rebotica de la farmacia de La Compañía, tal como estaba en 1928, antes de ser vendida a Sir Henry Welcome de Londres. Fuente: Pozo⁽³⁾

Tras su asesinato, toda la documentación existente sobre Milagro Almenara desapareció de forma extraña, con excepción de sus cartas políticas dirigidas a la JUF de Madrid y en 1942, lo que quedaba de la Farmacia de la Compañía de Milagro se depositó en el Colegio de Farmacéuticos, que declaró “inexistente” el establecimiento.

Sus recientes reconocimientos

Gracias sobre todo a las aportaciones de Gabriel Pozo ya citadas en el periódico “El Independiente” de Granada, en 2017^(3,4,5), la figura de Milagro Almenara Pérez ha comenzado a salir del olvido. Entre los últimos recordatorios a su persona pueden citarse los siguientes.

La Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, celebró un acto presidido por su rectora, Pilar Aranda, también farmacéutica, el 6 de marzo de 2018, a las 13.00 horas, en el Aula Magna de la Facultad de Farmacia, en el que se la homenajeó. En ese acto intervinieron la vicerrectora de Responsabilidad Social, Igualdad e Inclusión, Teresa María Ortega López, la decana de la Facultad de Farmacia, Ana Isabel del Moral, y el periodista y escritor Gabriel Pozo, quien impartió una conferencia titulada “Milagro, una inteligente farmacéutica en un tiempo difícil”⁽⁸⁾.

Asenjo publicó un artículo en el número 316 de la edición impresa de “Mundo Obrero”, en mayo de 2018, sobre su figura⁽⁹⁾ y ese mismo mes, el propio Pozo pronunció una conferencia sobre ella con motivo del centenario de la actual sede del Instituto Padre Suárez de Granada (antiguo Instituto Provincial de Granada, en el que ella estudió)⁽¹⁰⁾.

Similitudes entre las vidas de Milagro Almenara Pérez y Federico García Lorca

A continuación se analiza el hecho de que la vida de Milagro Almenara Pérez presenta muchas similitudes y semejanzas con la de Federico García Lorca, lo que prueba una hipótesis ligeramente insinuada por Pozo en sus contribuciones^(3,4,5), consistente en que puede establecerse un cierto “paralelismo” entre las vidas de ambos, a pesar de que no consta en ninguna referencia que los dos llegaran a conocerse, salvo posiblemente en el patio del Instituto en el que ambos estudiaron, y mucho menos que entablasen amistad.

1. Ciertamente, no es descabellado afirmar que ambos nacieron en la provincia de Granada, pues, aunque García Lorca lo hizo en Fuente Vaqueros (Granada), en junio de 1898 y Milagro nació en Santander, en agosto de 1900 de manera accidental provocada por su padre, su gestación y prácticamente todo el tiempo que pasó en el seno materno tuvo lugar en Granada capital. Por tanto, salvando la única circunstancia física del lugar de nacimiento, puede “entenderse” que ambos nacieron en la misma provincia y además con una diferencia de solo dos años y dos meses entre ellos.
2. Si se considera a Milagro como hija de Salvador de la Cámara, lo que realmente fue, a pesar de que su padre nunca llegara a reconocerla como tal, Milagro tuvo 7 hermanos, mientras que Federico tuvo 3. Los dos fueron, por tanto, miembros de familias numerosas, otro rasgo común en sus vidas.
3. Más tarde, los dos estudiaron en el mismo centro de enseñanza, el Instituto Provincial de Granada, con brillantes expedientes en ambos casos.
4. Los dos se sintieron atraídos durante su vida universitaria por otros ideales diferentes de los académicos, políticos en el caso de Milagro, sociales en el caso de Federico.
5. Ambos tuvieron amigos comunes. Entre ellos, Luis Mariscal Parado y Fernando de los Ríos. Luis fue compañero de promoción de Milagro en el Instituto y miembro, al igual que García Lorca, de la tertulia “El Rinconcillo”, que se daba cita en el Café Alameda de la Plaza del Campillo. Fernando de los Ríos, también miembro de esa tertulia, fue otro personaje común en sus vidas, desempeñando además un papel relevante en las mismas. También los dos, aunque Milagro de manera indirecta, conocían a Manuel de Falla, al haber intercedido la hermana de este, María del Carmen, por las vidas de ambos al ser detenidos, aunque sin éxito.
6. Ninguno de los dos llegó a casarse,
7. Otra semejanza en sus vidas la constituye el hecho de que ninguno de los dos pudiese contar con la ayuda de sus familias respectivas en sus momentos finales. Las circunstancias de la vida de Milagro ya han quedado aclaradas en su biografía, hasta el punto de que su madre fue considerada “madre soltera” cuando ella nació y su padre nunca llegó a reconocerla. Por su parte, cuando Federico fue denunciado, optó por buscar apoyo no en su familia sino en la de uno de sus amigos, Luis Rosales, pensando que los dos hermanos de Luis, falangistas en Granada, le podrían ayudar más que sus propios familiares.
8. Los dos fueron denostados y envidiados por la sociedad del momento, y acabaron fusilados prácticamente en la misma fecha y en la misma zona, en la carretera entre Víznar y Alfacar.
9. Sus cadáveres nunca aparecieron.

10. La Guerra Civil truncó sus carreras profesionales, la presumiblemente brillante de Milagro, primera mujer con farmacia abierta en Granada, con lo que eso suponía para su futuro y la con toda seguridad brillante carrera literaria futura de García Lorca.

11. Finalmente, y aunque hubo intentos por parte del bando franquista de hacer que la figura de García Lorca pasara al olvido, lo cual, afortunadamente, no sucedió, la figura de Milagro sí ha permanecido olvidada durante mucho tiempo, si bien ella, y sobre todo él, han recuperado actualmente la consideración y el reconocimiento de la sociedad que nunca debieron perder

Conclusiones

La biografía de Milagro Almenara es un ejemplo fehaciente de cómo la Guerra Civil trajo como una de sus consecuencias el olvido y destrucción de documentos y pertenencias de muchas personas por parte de ambos bandos, algunas de las cuales, afortunadamente, están siendo ahora rehabilitadas.

Por otra parte, ciertamente, podría pensarse que el razonamiento hecho por los autores en la subsección anterior para justificar el “paralelismo” entre la vida de esta farmacéutica y la de Federico García Lorca es artificial y forzado. Esto es en parte verdad, pero no es menos cierto que a ellos les ha servido para poner en valor la vida de Milagro Almenara y la aserción de la crudeza de una guerra que, en ambos bandos, ocasionó la pérdida de figuras con mentes privilegiadas que fueron empujadas, más allá de su propia muerte, al desconocimiento de la sociedad.

Bibliografía

1. Martín Martín C., López Andújar G., Cabezas López M.D. Mujeres notables en la Facultad de Farmacia de Granada (1850-1950). *Ars Pharm.* 2013; 54(3): 37-47.
2. Maurer, C. Federico García Lorca en Nueva York y La Habana: Cartas y recuerdos (Ilustrados): Editor: Andrew A. Anderson; 2020.
3. Pozo Felguera, G. La botica más antigua de Granada lleva casi un siglo embalada en Londres. “El Independiente” de Granada. 4 de marzo de 2017.
4. Pozo Felguera, G. Milagro Almenara Pérez, boticaria roja, feminista, asesinada en Víznar-Alfacar. “El Independiente” de Granada. 5 de marzo de 2017.
5. Pozo Felguera, G. La boticaria roja era hija natural del director del instituto provincial, pero murió sin reconocerla. “El Independiente” de Granada. 20 de agosto de 2017.
6. Núñez-Valdés, J., Venegas Fito, C.J., Ramos Carrillo, A. La primera mujer farmacéutica andaluza. *Ars Pharm.* 2019; 60(3):147-151.
7. Asociación Granadina para la Recuperación de la Memoria Histórica (AGRMH). Milagros Almenara: la boticaria roja. 21 de julio de 2018. Disponible en <http://granadamemoriahistorica.es/?p=1546>.
8. Canal / UGR. La UGR homenajea a la farmacéutica y feminista Milagro Almenara Pérez. 5 de marzo de 2018. Disponible en <https://canal.ugr.es/noticia/ugr-homenajea-milagro-almenara/>
9. Asenjo Pajares, M. Farmacéutica y roja... en Granada. “Mundo Obrero”. 7 de mayo de 2018.
10. S.V. El centenario edificio del Padre Suárez. “Granada Hoy”. 4 de febrero de 2018. Disponible en https://www.granadahoy.com/vivir/Bcentenario-Bedificio-Padre-Suarez_0_1215478720.html


doi: 10.30827/ars.v62i4.21094

Artículos originales

Medicamentos de elaboración o preparación no industrial: una nueva propuesta de clasificación

Non-industrially elaborated or prepared drugs: a new classification proposal

Alfonso Noguera-Peña^{1,2}  0000-0003-2462-1867

Carlos del Castillo-Rodríguez²  0000-0003-2247-5966.

¹Funcionario de carrera del Cuerpo de Farmacéuticos Titulares, Agencia de Información y Control Alimentarios, Madrid, España.

²Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria (Historia de la Farmacia y Legislación Farmacéutica), Madrid, España.

Correspondencia

Noguera-Peña, Alfonso
alfnogue@ucm.es

Recibido: 28.04.2021

Aceptado: 13.07.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Resumen

Introducción: Ni el legislador, ni los diferentes estudios previos han establecido una clasificación exhaustiva de los medicamentos de elaboración o preparación no industrial en el territorio regulatorio español.

Métodos: Revisión bibliográfica sobre la normativa (nacional y comunitaria) y estudios doctrinales relativos al marco jurídico de los medicamentos de uso humano, y el análisis de la misma.

Resultados: En la literatura no se encuentra una clasificación adecuada de los medicamentos de elaboración o preparación no industrial.

Conclusiones: Se ha propuesto una clasificación doctrinal de los medicamentos de elaboración o preparación no industrial basada en cuatro categorías principales.

Palabras clave: Legislación; Radiofármacos; Terapia avanzada; Terapia génica; Formulación magistral.

Abstract

Introduction: Neither the legislator nor the different previous studies have established an exhaustive classification of non-industrially elaborated or prepared drugs in the Spanish regulatory territory.

Method: Bibliographic review on the regulations (national and community) and doctrinal studies related to the legal framework of medicines for human use, and their analysis.

Results: There is no adequate classification of non-industrially elaborated or prepared drugs in the literature.

Conclusions: A doctrinal classification of non-industrially elaborated or prepared drugs has been proposed based on four main categories.

Keywords: Legislation; Radiopharmaceuticals; Advanced Therapy; Gene Therapy; Pharmacy compounding.

Puntos clave

Los autores son conocedores del complejo y variante marco jurídico-administrativo nacional y comunitario de los medicamentos, habiendo estudiado en los últimos años la legislación, la doctrina y la jurisprudencia sobre los mismos, lo que se ha traducido en que nuestros estudios y reflexiones han dado lugar a diversas publicaciones en torno a esta temática.

El estudio incorpora una propuesta novedosa de clasificación de los medicamentos de producción o elaboración ajena a los laboratorios farmacéuticos. Tradicionalmente en la literatura se ha dado un tratamiento independiente a las siguientes categorías de medicamentos: a) medicamentos de elaboración industrial, b) fórmulas magistrales y preparados oficinales. No obstante, entendemos que el grupo de “medicamentos de elaboración no industrial” es más amplio. Para defender esta clasificación no apuntada previamente, se aportan argumentos de valor basados en la regulación vigente de los medicamentos.

Nuestros resultados permitirán, por una parte, la mejora de la producción normativa por parte del legislador, lo que redundará en un claro beneficio para todos los agentes económicos del sector -y, en definitiva, también para los profesionales sanitarios y pacientes-. Además, también constituye una poderosa herramienta docente, ya que puede ser empleado para esclarecer las diferencias entre diferentes grupos de medicamentos. Finalmente, también puede constituir una herramienta de interés para los investigadores en el ámbito del marco legal de los medicamentos, en tanto que abre nuevas líneas de investigación relacionadas con los “medicamentos de elaboración no industrial”.

Introducción

En nuestro Derecho positivo, concretamente, en el artículo 8.1 del Real Decreto Legislativo 1/2015⁽¹⁾, se compendia los medicamentos con reconocimiento legal en los cinco grupos que se relacionan: a) los medicamentos de uso humano y b) los medicamentos veterinarios elaborados industrialmente o en cuya fabricación intervenga un proceso industrial; c) las fórmulas magistrales; d) los preparados oficinales; y, e) los medicamentos especiales previstos en esta norma.

El análisis del artículo citado permite diferenciar tres criterios para la clasificación de medicamentos, a saber: i) las especies destinadas al empleo de los medicamentos (medicamentos de uso humano y medicamentos veterinarios); ii) los medicamentos sometidos a una regulación concreta y específica -los “medicamentos especiales”, de aquellos para los que no se han adoptado disposiciones adicionales, y finalmente, iii) los locales de fabricación, elaboración o preparación de los medicamentos.

Este último criterio ha llamado especialmente nuestro interés, toda vez que permite la agrupación de los medicamentos en dos grandes grupos. Por una parte, la regulación de los medicamentos fabricados industrialmente está armonizada a nivel de la Unión Europea a través de la Directiva 2001/83/CE⁽²⁾ en el caso de los medicamentos de uso humano, cuyas modificaciones introducidas en el año 2004 son transpuestas en nuestro ordenamiento jurídico a través del Real Decreto 1345/2007⁽³⁾.

En el caso de los medicamentos veterinarios, resulta de aplicación directa a los Estados miembros el Reglamento (UE) 2019/6⁽⁴⁻⁵⁾, aunque siguen en vigor las particularidades establecidas en el Real Decreto 109/1995⁽⁶⁾. Los medicamentos veterinarios de fabricación industrial se regulan, además, a través del Real Decreto 1246/2008⁽⁷⁾.

Por otro lado, se sitúan los medicamentos elaborados o preparados en oficinas de farmacia, servicios de farmacia hospitalaria, esto es, locales de carácter no industrial. Dentro de esta última categoría se han aglutinado exclusivamente las fórmulas magistrales -tipificadas o no- y los preparados oficinales. Sin embargo, consideramos que también pueden incorporarse en esta agrupación otros grupos de medicamentos reconocidos legalmente.

Una de las características más significativas de los medicamentos de elaboración o preparación industrial, claramente distintiva del resto de los productos de consumo, es que las autoridades regulatorias requieren una autorización administrativa para la introducción de estos bienes económicos en

los mercados, de tal manera que los laboratorios farmacéuticos solicitarán una autorización de comercialización de los medicamentos, y no podrá realizarse una distribución -para su venta- en el territorio nacional hasta que haya concluido satisfactoriamente la evaluación de la relación beneficio/riesgo del medicamento por parte de las autoridades competentes en materia de sanidad (cfr. artículo 9.1 del Real Decreto Legislativo 1/2015⁽¹⁾ y artículo 6 de la Directiva 2001/83/CE⁽²⁾). No obstante, los medicamentos de elaboración o preparación no industrial no se ven afectados por este requerimiento (Tabla 1).

Con respecto a la intervención sobre los medicamentos de fabricación industrial, expone VILLALBA PEREZ que “la autorización sanitaria constituye el elemento formal del concepto jurídico de medicamento. Un medicamento no podrá ser considerado como tal si, aun englobándose en la definición legal de medicamento, no ha obtenido la pertinente autorización de comercialización por las autoridades competentes”⁽⁸⁾. Como ocurre en diversos ámbitos del derecho, existe la excepción y este la esencia de este trabajo es el análisis de esa singularidad.

Nuestro objetivo es analizar la clasificación de los medicamentos adoptada, por una parte, por el legislador nacional y comunitario y, además, las propuestas por diferentes autores, con el fin de proponer una nueva clasificación para los medicamentos de elaboración o preparación no industrial.

Tabla 1. Comparativa entre medicamentos de fabricación industrial y medicamentos de preparación no industrial.

| | Medicamentos de fabricación industrial | Fórmulas magistrales | Preparados oficinales | Radiofármacos de preparación no industrial | Medicamentos de terapias avanzadas de elaboración no industrial |
|---|--|---|-----------------------|--|---|
| Armonización comunitaria | SÍ (1) | NO | | SÍ (1) | |
| Exigencia cumplimiento de las Normas de Correcta Fabricación | SÍ | NO (2) | NO (2) | NO (3) | SÍ (Parte IV) |
| Descripción en el Formulario Nacional | NO | SÍ (4) | SÍ | NO | |
| Requerimiento de una autorización de comercialización | SÍ | NO | | NO (4) | NO (5) (6) |
| Plazo de renovación de la autorización | 5 años (7) | N/A | | | 3 años (7) |
| Posibilidad de exportación | SÍ (8) | NO | | | |
| Lugar de fabricación/preparación | Laboratorios farmacéuticos | Oficinas de farmacia / Servicios de farmacia hospitalaria | | Servicios de farmacia hospitalaria (Unidad de radiofarmacia) | Servicios de farmacia hospitalaria |

(1) A través de la Directiva 2001/83/CE⁽²⁾.

(2) En su caso, se velará por el cumplimiento de las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales, establecidas en el Real Decreto 175/2001, de 23 de febrero⁽⁹⁾.

(3) En su caso, se velará por el cumplimiento de las Normas de Buena Preparación Radiofarmacéutica, aprobadas por el Real Decreto 479/1993, de 2 de abril⁽¹⁰⁾ (disposición normativa derogada).

(4) Sólo en el caso de las fórmulas magistrales tipificadas.

(5) Con excepción de la fabricación industrial de los siguientes medicamentos: a) generadores, b) equipos reactivos, c) precursores, d) radiofármacos, y e) medicamentos de terapia avanzada se efectúe a nivel industrial.

(6) Se establece, en su lugar, una autorización de uso por parte de la AEMPS en el marco de una determinada institución hospitalaria ubicada a nivel nacional.

(7) Las autorizaciones de comercialización de los medicamentos de fabricación industrial requieren una única renovación, y una vez obtenida ésta, posteriormente adquieren carácter indefinido. En cambio, las autorizaciones de uso de los medicamentos de terapias avanzadas serán renovadas periódicamente con carácter quinquenal.

(8) El desarrollo reglamentario del comercio exterior de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos veterinarios se encuentra en el Real Decreto 824/2010, de 25 de junio⁽¹¹⁾.

Métodos

Se ha efectuado una revisión bibliográfica sobre la normativa (nacional y comunitaria) relativa al marco jurídico de los medicamentos de uso humano, y el análisis de la misma. Asimismo, se han examinado la literatura sobre Legislación Farmacéutica, concretamente, en torno a la clasificación doctrinal de los medicamentos.

Resultados

Los manuales docentes y didácticos⁽¹²⁻¹⁹⁾ se han limitado al examen independiente del régimen jurídico aplicable a las fórmulas magistrales y los preparados oficinales, frente a los medicamentos de fabricación industrial. Asimismo, los estudios doctrinales examinados⁽²⁰⁻²⁴⁾ no se han preocupado por el establecimiento de los diferentes grupos de medicamentos de elaboración no industrial, de tal manera que los diferentes grupos de medicamentos de preparación no industrial han sido tratados de manera irregular, independiente, y tampoco se han esbozado la similitud respecto a varios grupos heterogéneos de medicamentos que comparten una trascendente característica común: su elaboración, producción y control de calidad en entornos no industriales.

A lo anterior, debe sumarse que existen escasas publicaciones que analizan el marco normativo nacional⁽²⁵⁻²⁹⁾ o internacional⁽³⁰⁾ relativo a los radiofármacos, las cuales resultan poco numerosas en el caso de los medicamentos de terapia avanzada⁽³¹⁻³⁷⁾, motivo por el cual puede entenderse que hasta la fecha no se haya propuesto una clasificación doctrinal de medicamentos de elaboración o preparación no industrial. Por el contrario, la formulación magistral ha sido explorada en mayor medida tanto en publicaciones periódicas⁽³⁸⁻⁴⁰⁾, como en monografías⁽¹²⁻¹⁹⁾.

En suma, hasta la fecha, la literatura ha tratado de forma independiente a las fórmulas magistrales y los preparados medicinales del resto de medicamentos, debido a su elaboración o preparación artesanal, sin llegar a establecerse que existen otros grupos de medicamentos cuya elaboración tampoco se efectúa a nivel industrial.

Discusión

La clasificación adoptada por el legislador nacional en el artículo 8.1 del Real Decreto Legislativo 1/2015⁽¹⁾ no es exhaustiva, ni tiene la precisión suficiente para establecer categorías de medicamentos, habida cuenta de la enorme variedad y complejidad de estos recursos sanitarios, motivo por el cual, los medicamentos son clasificados indirectamente a lo largo del articulado del texto normativo en categorías adicionales. Sin embargo, a pesar de la existencia de normas reguladoras de los medicamentos de fabricación industrial⁽²⁻³⁾, no se configura ninguna categoría específica de medicamentos de elaboración o preparación no industrial, ni tampoco se detalla explícitamente en nuestro ordenamiento jurídico los grupos de medicamentos que quedan excluidos del ámbito de aplicación de las normas reguladoras específicamente de los medicamentos de elaboración industrial.

Se presenta una clasificación de los medicamentos de preparación o elaboración no industrial, teniendo en cuenta además no sólo las categorías tradicionalmente reconocidas en la literatura (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de medicamentos de preparación o elaboración no industrial.

| | Definición | Referencia normativa |
|-----------------------------|---|---|
| 1. Fórmula magistral | Medicamento destinado a un paciente individualizado, preparado por un farmacéutico, o bajo su dirección, para cumplimentar expresamente una prescripción facultativa detallada de los principios activos que incluye, según las normas de correcta elaboración y control de calidad establecidas al efecto, dispensado en oficina de farmacia o servicio farmacéutico y con la debida información al usuario. | Artículo 2, letra i) del Real Decreto Legislativo 1/2015 ⁽¹⁾ |

| | Definición | Referencia normativa |
|---|---|---|
| 1.1. Fórmula magistral tipificada | Aquella recogida en el Formulario Nacional, por razón de su frecuente uso y utilidad. | Capítulo Preliminar del Real Decreto 175/2001 ⁽⁷⁾ |
| 1.2. Fórmula magistral destinada a los animales | La prescrita por un veterinario y destinada a un animal individualizado o a un reducido número de animales de una explotación concreta, bajo el cuidado directo de dicho facultativo, y preparado por un farmacéutico o bajo su dirección en su oficina de farmacia. | Artículo 8, apartado 10 del Real Decreto 109/1995 ⁽⁶⁾ |
| 2. Preparado oficial | Medicamento elaborado según las normas de correcta elaboración y control de calidad establecidas al efecto y garantizado por un farmacéutico o bajo su dirección, dispensado en oficina de farmacia o servicio farmacéutico, enumerado y descrito por el Formulario Nacional, destinado a su entrega directa a los enfermos a los que abastece dicha farmacia o servicio farmacéutico. | Artículo 2, letra j) del Real Decreto Legislativo 1/2015 ⁽¹⁾ |
| 3. Radiofármaco | Cualquier producto que, cuando esté preparado para su uso con finalidad terapéutica o diagnóstica, contenga uno o más radionucleidos (isótopos radiactivos). | Artículo 48.1, letra a) del Real Decreto Legislativo 1/2015 ⁽¹⁾ |
| 4. Medicamento de terapia avanzada | Cualquiera de los siguientes medicamentos para uso humano: a) medicamento de terapia génica; b) medicamento de terapia celular somática, c) producto de ingeniería tisular, d) medicamento combinado de terapia avanzada. | Artículo 2.1 del Real Decreto 477/2014 ⁽⁴¹⁾ |
| 4.1. Medicamentos de terapia avanzada de uso consolidado | Aquel medicamento de terapia avanzada para el que se demuestre que se ha estado utilizando de un modo regular en una institución hospitalaria concreta antes del 14 de junio de 2014, exceptuando el empleo en un ensayo clínico o en un uso compasivo. | Artículo 2.2 del Real Decreto 477/2014 ⁽⁴¹⁾ |
| 4.2. Medicamento de terapia génica | Medicamento biológico que, sin ser una vacuna contra las enfermedades infecciosas, cumple los siguientes requisitos: a) incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica; b) su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia. | Anexo I, parte IV, del Real Decreto 1345/2007 ⁽³⁾ , transposición del anexo I, parte IV, de la Directiva 2001/83/CE ⁽²⁾ |
| 4.3. Medicamento de terapia celular somática | Medicamento biológico que satisface las siguientes condiciones: a) contiene células o tejidos, o está constituido por ellos, que han sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para el uso clínico previsto, o por células o tejidos que no se pretende destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante; b) se presenta con propiedades para ser usado por seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad mediante la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de sus células o tejidos. | Anexo I, parte IV, del Real Decreto 1345/2007 ⁽³⁾ , transposición del anexo I, parte IV, de la Directiva 2001/83/CE ⁽²⁾ |

| | Definición | Referencia normativa |
|---|---|---|
| 4.4. Producto de ingeniería tisular | <p>Medicamento que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y del que se alega que tiene propiedades, se emplea o se administra a las personas para regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano.</p> <p>Puede contener células o tejidos -viables o no- de origen humano, animal, o ambos, así como productos celulares, biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, soportes o matrices.</p> <p>Quedan excluidos los productos que no ejerzan principalmente una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, y a) que contienen o están formados exclusivamente por células y/o tejidos humanos o animales no viables, o bien, b) que no contengan células o tejidos viables.</p> | Artículo 2.1, letra b) del Reglamento 1394/2007 ⁽⁴²⁾ |
| 4.5. Medicamento combinado de terapia avanzada | <p>Medicamento de terapia avanzada que cumple con las siguientes condiciones: a) tiene que incorporar, como parte integrante del mismo, uno o más productos sanitarios -éstos pueden ser productos sanitarios implantables activos-; b) su parte celular o tisular tiene que contener células o tejidos viables, o su parte celular o tisular que contenga células o tejidos no viables tiene que poder ejercer en el organismo humano una acción que pueda considerarse fundamental respecto de la de los productos sanitarios.</p> | Artículo 2.1, letra d) del Reglamento 1394/2007 ⁽⁴²⁾ |

Con respecto a los radiofármacos, debe matizarse que no todos éstos son medicamentos de elaboración o preparación no industrial, sino que una parte de los mismos son elaborados por parte de los laboratorios farmacéuticos debidamente autorizados por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Se establecen, pues, tres supuestos en los que los radiofármacos se elaboran en una unidad de radiofarmacia de una instalación hospitalaria y, por tanto, no se requiere una autorización administrativa para su comercialización por parte de las autoridades sanitarias competentes, a saber: a) la preparación de forma extemporánea de radiofármacos, entendiendo por tales a aquellos que se preparan de forma previa a su uso, “a partir del marcaje radioisotópico de un equipo o de muestras autólogas del propio paciente (células, proteínas), con un radionucleido precursor o un radionucleido producido por un generador de radionucleido”, para dar cumplimiento a una prescripción facultativa, a tenor de lo dispuesto en el artículo 2.26 del Real Decreto 1345/2007⁽³⁾; b) la preparación de radiofármacos utilizados para tomografía por emisión de positrones (radiofármacos PET) que sean elaborados íntegramente y utilizados, sin ánimo de lucro, en centros vinculados al Sistema Nacional de Salud y, además, sean sustancias en fase de investigación clínica, o bien, sean medicamentos que la AEMPS considera que satisfacen las garantías de calidad, seguridad, eficacia, identificación e información, y que se elaboren en instalaciones adecuadas [artículo 47.1, letra c) del Real Decreto 1345/2007⁽³⁾; artículo 48.5 Real Decreto Legislativo 1/2015⁽¹⁾], y b) la preparación -en el momento de su uso- de muestras autólogas dónde participen radioisótopos, así como la extracción de dosis individuales de radiofármacos listos para su uso [artículo 47.1, letra b) del Real Decreto 1345/2007⁽³⁾; artículo 48.4 Real Decreto Legislativo 1/2015⁽¹⁾].

Conclusiones

Se ha realizado una propuesta de clasificación doctrinal de los medicamentos de elaboración o preparación no industrial -esto es, medicamentos que no requieren una autorización preceptiva de forma previa a su introducción en el mercado- basada en cuatro categorías principales, algunas de las cuales, a su vez, permiten la consideración de subcategorías. Esta clasificación también tiene interés docente.

Bibliografía

1. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado 177 (de 25 de julio de 2015).
2. Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea L311. (28 de noviembre de 2001).
3. Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. Boletín Oficial del Estado 193 (de 7 de noviembre de 2007).
4. Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. Diario Oficial de la Unión Europea L4. (7 de enero de 2019).
5. Noguera Peña, A. La regulación de los medicamentos veterinarios en España”, An Real Acad Farm. 20020: 86,3:215.
6. Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. Boletín Oficial del Estado 53 (de 3 de marzo de 1995).
7. Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente. Boletín Oficial del Estado 193 (de 11 de agosto de 2008).
8. Villalba Pérez F L, La profesión farmacéutica. Madrid: Marcial Pons, 1996. 382 p.
9. Real Decreto 175/2001, de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales. Boletín Oficial del Estado 65 (de 16 de marzo de 2001).
10. Real Decreto 479/1993, de 2 de abril, por el que se regulan los medicamentos radiofármacos de uso humano. Boletín Oficial del Estado 109 (de 7 de mayo de 1993).
11. Real Decreto 824/2010, de 25 de junio, por el que se regulan los laboratorios farmacéuticos, los fabricantes de principios activos de uso farmacéutico y el comercio exterior de medicamentos y medicamentos en investigación. Boletín Oficial del Estado 165 (de 8 de julio de 2010).
12. González Bueno A [I]. Manual de legislación farmacéutica. 1ª ed. Aranjuez: Doce Calles; 1994. 543 p.
13. González Bueno A [I]. Manual de legislación farmacéutica. 2ª ed. Aranjuez: Doce Calles; 1999. 680 p.
14. González Bueno A [I]. Manual de legislación farmacéutica. 3ª ed. Madrid: Síntesis; 2004. 569 p.
15. González Bueno A [I], Del Castillo Rodríguez C. Manual de legislación farmacéutica. 4ª ed. Madrid: La Botella de Leyden; 2017. 344 p.
16. González Bueno A [I], Del Castillo Rodríguez C. Manual de legislación farmacéutica. 5ª ed. Madrid: Dykinson; 2019. 355 p.
17. González Bueno A [I], Del Castillo Rodríguez C, González Leonor M del C. Manual de legislación farmacéutica. 6ª ed. Madrid: Dykinson; 2020. 370 p.
18. Puerto Sarmiento FJ, González Bueno A [I]. Compendio de Historia de la farmacia y Legislación Farmacéutica. Madrid: Síntesis; 2011. 491 p.
19. Suñé Arbussá JM, Bel Prieto E. Legislación farmacéutica española. 11ª ed. Barcelona: Romargraf; 1997. 602 p.
20. Vidal Casero M del C. Derecho farmacéutico: legislación, jurisprudencia, el ejercicio profesional. Valencia: Revista General de Derecho; 2007. 1080 p.
21. Vidal Casero M del C. Derecho farmacéutico. Pamplona: Aranzadi; 2008. 2294 p.

22. Sarrato Martínez L. Régimen jurídico-administrativo del medicamento [Internet] [Tesis (Doctorado)]. [Lleida]: Universidad de Lleida; 2013 [citado 27 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/131226>
23. Bombillar Sáenz FM. Intervención administrativa y régimen jurídico del medicamento en la Unión Europea [Internet] [Tesis (Doctorado)]. [Granada]: Universidad de Granada; 2010 [citado 27 de enero de 2021]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10481/4863>
24. Martín Castro D. La definición de los medicamentos y su distinción de otros productos para la salud. En: Faus Santasusana J, Vida Fernández J, editores. Tratado de derecho farmacéutico: estudio del régimen jurídico de los medicamentos. Cizur Menor: Aranzadi; 2017. p. 163-214.
25. Valverde López JL, Ramírez Navarro ÁM, Navarro Muros IM, Martín Castilla D. Nuevas perspectivas en materia de radiofármacos. *Acofar Rev Distrib Farm Coop.* 1993;317:16-9.
26. Cortés-Blanco A, López de la Rica Manjavacas A, Martínez-Lázaro R, Vargas Castrillón S, Cutanda Henríquez F, Hernández García [César]. Información incluida en la ficha técnica de los radiofármacos de uso humano autorizados para comercialización en España. *Rev Esp Med Nucl.* 2011;30(1):41-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.remnu.2010.10.006>
27. Cortés-Blanco A, Esteban Gómez J. Radiofármacos de uso humano: marco legal e indicaciones clínicas autorizadas en España. *Segur Nucl.* 2003;26:5-15.
28. Cortés-Blanco A. Radiofármacos PET de uso humano en España: pasado y presente. *Segur Nucl.* 2007;42:28-35.
29. Cortés-Blanco A, Esteban Gómez J. Limitación de la dosis de radiaciones para los sujetos participantes en programas de investigación médica o biomédica con radiofármacos: normativa aplicable en España. *Segur Nucl.* 2004;31:7-14.
30. Sharma S, Jain S, Baldi A, Singh RK, Sharma RK. Intricacies in the Approval of Radiopharmaceuticals – Regulatory Perspectives and the Way Forward. *Curr Sci.* 2019;116(1):47-55. DOI: <https://doi.org/10.18520/cs/v116/i1/47-55>
31. Timón M, Ruiz Antúnez S. Bases regulatorias de los medicamentos de origen biotecnológico. *Rev Esp Econ Salud.* 2007;61(6):346-51.
32. Salmerón F. Biológicos, de origen humano y de terapias avanzadas especiales. En: Abad L, editor. Curso básico de derecho farmacéutico: 100 cuestiones esenciales. 2ª ed. Madrid: Asociación Española de Derecho Farmacéutico; 2008. p. 95-101.
33. Salmerón F. Biológicos y de origen humano, y de terapias avanzadas. En: Manuel García J, editor. Curso básico de derecho farmacéutico: 100 cuestiones esenciales. 3ª ed. Madrid: Instituto de Legislación Farmacéutica; 2014. p. 114-24.
34. Committee for Advanced Therapies (CAT). Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):195-201. <https://doi.org/10.1038/nrd3052>
35. Committee for Advanced Therapies. Use of unregulated stem-cell based medicinal products. *The Lancet.* 2010;376(9740):514. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61249-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61249-4)
36. Ríos Serrano I. El desafío de las Normas de Correcta Fabricación específicas para medicamentos de terapia avanzada en la Unión Europea, *Pharmatech.* 2019;41:58-64.
37. Ruiz Antúnez S. Regulación de medicamentos de terapia avanzada en la Unión Europea, *Pharmatech.* 2019;41:44-50.
38. Bel Prieto E. Elaboración por terceros en la formulación magistral. ¿Hasta dónde llega? *An Real Acad Nac Farm.* 2005;4(4):799-821.
39. Bonet Clois F, Bel Prieto E. Estudio comparativo de la legislación sobre formulación magistral. II. Regulación en Estados Unidos y conclusiones. *Offarm Farm Soc.* 2001;20(1):126-8.

40. Flores D, Abarca E. La formulación de medicamentos individualizados en veterinaria. Aspectos legales relevantes. *Clínica Vet Pequeños Anim.* 2017;37(1):7-14.

41. Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial. *Boletín Oficial del Estado* 144 (de 14 de junio de 2014).

42. Reglamento (CE) n.º 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) n.º 726/2004. *Diario Oficial de la Unión Europea* L324 (10 de diciembre de 2007).

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.20980

Artículos de revisión

Resistencia a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR en el tratamiento del carcinoma de cabeza y cuello

Resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of head and neck carcinoma

Yaily Lazo Roblejo¹  0000-0001-5624-4117

Maraelys Morales González²  0000-0003-0350-2797

¹Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, Cuba.

²Universidad de Oriente, Cuba.

Correspondencia

Yaily Lazo Roblejo
yailylazor78@gmail.com

Recibido: 10.04.2021

Aceptado: 21.06.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Resumen

Introducción: Los anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) han demostrado beneficio clínico en el carcinoma de cabeza y cuello en estadios avanzados, sin embargo, a pesar de los alentadores resultados iniciales, los estudios clínicos evidencian que hay pacientes que presentan tasas de respuesta muy pobres o nulas con su uso.

Método: Se realizó una revisión de la bibliografía científica en las fuentes especializadas Medline, Cochrane Library y Google académico sobre los mecanismos moleculares de resistencia que pueden estar involucrados en la reducción de la eficacia de los anticuerpos monoclonales cetuximab y nimotuzumab.

Resultados: En el caso del cetuximab, se exponen los mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida tales como: la presencia de los polimorfismos EGFR-K₅₂₁ y AURKA Phe31-Ile, la activación de puntos calientes de mutaciones en PIK3CA y KRAS/HRAS, la pérdida de expresión de PTEN, las mutaciones en el dominio extracelular del EGFR, la sobreexpresión de MET e inducción de la transición epitelial-mesenquimal, así como algunos mecanismos que involucran las vías AKT/PI3K, RAS/RAF/MEK/ERK y JAK/STAT. Con respecto al nimotuzumab, la literatura refiere que los mejores resultados clínicos con su uso se han asociado con la sobreexpresión del EGFR.

Conclusiones: Los mayores desafíos en el carcinoma de cabeza y cuello son comprender la resistencia a estas terapias e identificar biomarcadores predictivos de respuesta para la selección adecuada de los pacientes. Aunque son múltiples las propuestas de biomarcadores que se publican, requieren su validación en ensayos clínicos prospectivos para su introducción en la práctica clínica habitual. Se sugiere la necesidad de incrementar los estudios sobre los mecanismos de resistencia al nimotuzumab.

Palabras clave: biomarcadores predictivos; carcinoma de cabeza y cuello; cetuximab; mecanismos de resistencia; nimotuzumab.

Abstract

Introduction: Monoclonal antibodies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) have shown clinical benefit in advanced stages of head and neck carcinoma; however, despite encouraging initial results, clinical studies show that there are patients who present rates very poor or null response with its use.

Method: A review of the scientific literature was carried out in the specialized sources Medline, Cochrane Library and academic Google on the molecular mechanisms of resistance that may be involved in reducing the efficacy of the monoclonal antibodies cetuximab and nimotuzumab.

Results: In the case of cetuximab, the mechanisms of intrinsic and acquired resistance are exposed, such as: the presence of the EGFR-K₅₂₁ and AURKA Phe31-Ile polymorphisms, the hot spots activating PIK3CA and KRAS/HRAS mutations, the loss of PTEN protein expression, mutations in the extracellular domain of EGFR, overexpression of MET and induction of epithelial-mesenchymal transition, as well as some mechanisms involving the AKT/PI3K, RAS/RAF/MEK/ERK and JAK/STAT pathways. About nimotuzumab, the literature refers that the best clinical results with its use have been associated with EGFR overexpression.

Conclusions: The greatest challenges in head and neck carcinoma are understanding resistance to these therapies and identifying predictive biomarkers of response for proper patient selection. Although there are multiple proposals for biomarkers that are published, they require their validation in prospective clinical trials for their introduction into routine clinical practice. The need to increase studies on the mechanisms of resistance to nimotuzumab is suggested.

Keywords: cetuximab; head and neck carcinoma; mechanisms of resistance; nimotuzumab; predictive biomarkers.

Puntos clave

El trabajo expone algunos mecanismos moleculares de resistencia, tanto intrínseca como adquirida, reportados por diferentes investigadores, que pueden estar involucrados en la reducción de la eficacia de los anticuerpos monoclonales específicamente dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico, aspecto que limita el beneficio clínico de estas terapias en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en estadios avanzados y que constituye a su vez uno de los mayores desafíos en la lucha contra esta enfermedad en la actualidad.

El estudio de la resistencia a estas terapias se ha focalizado al cetuximab, que es el anticuerpo monoclonal de referencia, el de mayor desarrollo clínico y el único aprobado por la FDA en el tratamiento de estos tumores, sin embargo, muy poco se ha publicado en este sentido en la literatura científica con respecto al nimotuzumab, anticuerpo monoclonal aprobado en Cuba desde el 2002 y ampliamente utilizado en el tratamiento de este tipo de cáncer y además registrado en otros 28 países. Su aporte a la literatura es presentar un artículo donde se aborda al nimotuzumab, pero con un nuevo enfoque, el de la resistencia. Se presentan los resultados positivos obtenidos con su empleo, pero también se demuestra la falta de respuesta clínica en algunos pacientes, que evidencian la necesidad de acrecentar las investigaciones en este sentido.

Las implicaciones para la práctica son comunicar a la comunidad científica la existencia de un área del conocimiento que precisa una mayor investigación, cuyos resultados pueden permitir el estudio e identificación de nuevos mecanismos moleculares de resistencia o la validación de mecanismos ya reportados para el cetuximab y que pueden estar presentes en el nimotuzumab.

Introducción

Los carcinomas de cabeza y cuello (CCC) constituyen un grupo heterogéneo de tumores que se localizan en los senos paranasales y cavidad nasal, nasofaringe, orofaringe (amígdala, paladar blando y base de la lengua), hipofaringe, laringe (glotis, subglotis y supraglotis), cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua móvil y suelo de boca), labio y glándulas salivares^(1,2). Se clasifican histológicamente de acuerdo con el tipo celular afectado. De esta manera, se observa que la mayor frecuencia de tumores es de etiología epitelial (>90 %) y la minoría son tumores mesenquimales o de estirpe hematolinfóide. El carcinoma escamoso es el tipo histológico más frecuente y representa prácticamente el 100 % de los tumores epiteliales de cabeza y cuello⁽¹⁾.

El CCC tiene una incidencia de alrededor un 4-5 %; representa la quinta neoplasia en la población mundial y séptima en cuanto a mortalidad. Cada año se diagnostican unos 650.000 casos nuevos y ocurren aproximadamente 350.000 fallecimientos anuales por esta causa. La falta de terapias efectivas contribuye a la mortalidad de los pacientes^(2,3). Estos tumores se presentan notablemente más en hombres que en mujeres, con una relación que oscila de 2:1 a 4:1⁽¹⁾.

Cuba, según el último registro de incidencia que data del año 2016, reportó una incidencia de 2.906 casos nuevos. El cáncer de labio, cavidad bucal y faringe y el cáncer de laringe ocupaban el cuarto y el sexto lugar en incidencia para el sexo masculino, con una tasa bruta de 25,0 y 19,8 por 100.000 habitantes, respectivamente⁽⁴⁾.

De acuerdo a los datos del Anuario Estadístico de Salud de Cuba, durante el 2019 se produjeron 893 defunciones por tumores de labio, cavidad bucal y faringe y 891 defunciones por cáncer de laringe, lo cual representó tasas de 8,0 y 7,9 por cada 100.000 habitantes, respectivamente⁽⁵⁾.

Los clásicos factores de riesgo asociados al desarrollo de CCC son el consumo de tabaco y alcohol. Investigaciones más recientes han relacionado el CCC con la posible exposición a otros factores contribuyentes como el virus del papiloma humano (VPH) subtipo 16 y el Virus de Epstein-Barr (VEB)⁽⁶⁻⁸⁾.

El pronóstico de los pacientes es variable y depende del estadio del tumor en el momento del diagnóstico. La supervivencia relativa a los cinco años está entre el 76-83 % en pacientes con tumores locali-

zados (estadio I-II), del 45-63 % en pacientes con tumores locorregionales avanzados (III, IVA y IVB) y 35-38 % con tumores en estadio metastásico (IVC)⁽⁹⁾.

La cirugía y la radioterapia (RT) son los métodos terapéuticos clásicos en el tratamiento locorregional del CCC. En general, las lesiones de pequeño tamaño sin afectación cervical importante, estadios I y II, se tratan indistintamente con cirugía o con RT. Ambas modalidades de tratamiento pueden considerarse igualmente efectivas, optando por una u otra en función de diferentes factores. En tumores de mayor volumen, suele ser necesario la combinación de ambas modalidades. En los pacientes en estadios localmente avanzados se realiza una terapia multimodal secuencial que engloba cirugía, RT y quimioterapia (QT)^(8,10). Para tumores inoperables, la alternativa que se prefiere es la quimio-radioterapia (QRT) o RT más anticuerpos monoclonales (AcM)⁽¹¹⁾.

Más del 80 % de los casos de CCC se diagnostican con enfermedad locorregional avanzada. A pesar de los avances en el tratamiento multimodal, más de la mitad de los pacientes no son curados y recaen localmente o en sitios distantes en algún momento de su evolución. De estos sólo un número muy limitado de pacientes son candidatos para cirugía o re-irradiación. Los pacientes no aptos para dicho tratamiento suelen recibir QT. El pronóstico es desfavorable, pues la supervivencia global (SG) esperada en pacientes con cáncer epidermoide recurrente o metastásico se encuentra en torno a los 6-12 meses^(9,12,13).

La incorporación de AcM anti-EGFR, como el cetuximab y nimotuzumab, al tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) en estadios avanzados, en combinación con los citotóxicos clásicos y/o RT, son la única estrategia hasta la fecha que ha demostrado una mejoría significativa en el control locorregional (CLR) y la supervivencia de los pacientes, por esta razón constituye una opción terapéutica muy valiosa^(11,14,15).

El objetivo del presente trabajo es exponer algunos mecanismos de resistencia, tanto intrínseca como adquirida, reportados por diferentes investigadores, que pueden estar involucrados en la reducción de la eficacia de los AcM anti-EGFR, aspecto que limita el beneficio clínico de estas terapias en el tratamiento del CCECC en estadios avanzados y que constituye a su vez uno de los mayores desafíos en la lucha contra esta enfermedad.

Métodos

Se realizó una revisión de la bibliografía científica en las fuentes especializadas Medline (vía Pubmed), Cochrane Library y Google académico, en el período de 2005-2020. Para definir los términos de búsqueda se empleó el Medical Subject Headings (MeSH). Se consideraron adecuados los descriptores siguientes: "cetuximab", "nimotuzumab", "head and neck squamous cell carcinoma", "mechanism of resistance", "biomarker". Para la identificación de los artículos se verificó que los términos buscados se encontraran en el título o en el resumen. Se incluyeron los estudios originales realizados *in vitro*, en animales o en humanos cuyos resultados estuvieran relacionados directamente con el objetivo de la revisión, con acceso a texto completo y la selección de estos realizó en base a su mayor actualización y claridad. Se excluyeron las revisiones, los comentarios, cartas, los trabajos duplicados y los artículos publicados en un idioma diferente al inglés o español.

Resultados

La selección de los estudios se realizó según el diagrama de flujo PRISMA (Figura 1). La estrategia de búsqueda en las bases de datos permitió identificar inicialmente 231 artículos, de estos, 225 correspondieron al cetuximab y 6 al nimotuzumab. Se evaluaron 82 artículos en texto completo para su elegibilidad y finalmente 17 cumplieron con los criterios de inclusión. De los 17 trabajos evaluados, 7 estudios fueron realizados *in vitro*, 6 se ejecutaron *in vitro* y en animales, 1 fue desarrollado *in vitro*, en animales y humanos y 3 fueron en humanos.

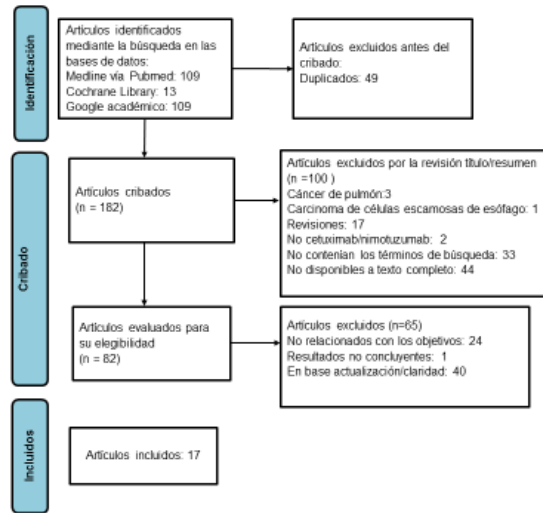


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA para la selección de los artículos.

Cetuximab en el tratamiento del CCECC

El cetuximab es un AcM quimérico de inmunoglobulina G1 (IgG1), específicamente dirigido al EGFR⁽¹⁶⁾. El EGFR también conocido como ErbB-1 o HER1, es un miembro de la familia de receptores ErbB. Es una glicoproteína transmembranal con un peso molecular de 170 kDa, que pertenece a una familia de receptores con actividad tirosina quinasa, que inician una cascada de señalización intracelular a partir de la unión de los factores de crecimiento, que incluye las vías RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR y de JAK/STAT. Esto se relaciona con un aumento de la proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, metástasis, así como con disminución de la apoptosis. El EGFR se encuentra sobreexpresado en el 90 % o más de los casos de CCC y está asociado con un mal pronóstico y resistencia a los tratamientos oncológicos convencionales como la RT y QT. En base a esto, esta molécula se propuso como una buena diana para el tratamiento del cáncer⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

El cetuximab se une con alta especificidad al dominio extracelular del EGFR y bloquea competitivamente la unión de los dos principales ligandos endógenos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor transformante de crecimiento alfa (TGF α). Su unión al EGFR impide la estimulación del receptor y como resultado de ello, se inhibe la cascada de reacciones en la vía molecular correspondiente, cuya consecuencia es la inhibición de la proliferación celular, el incremento de la apoptosis, así como una reducción de la angiogénesis, la invasividad y metástasis. La unión del cetuximab al EGFR también promueve la internalización y posterior degradación del receptor en los compartimentos endosomales, esto a su vez incrementa la velocidad de degradación de esta molécula y disminuye el número de receptores disponibles en la superficie para señalizar^(14,21-23).

Además, el cetuximab es un potente inductor de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y algunos estudios han demostrado que el AcM produce una marcada sinergia en combinación con la QT en una variedad de tipos y modelos de células tumorales y también mejora la sensibilidad a la RT⁽²¹⁻²³⁾.

El cetuximab es el primer AcM antagonista del EGFR aprobado por la Agencia Reguladora de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, siglas en inglés) para su aplicación en pacientes y se considera el AcM anti-EGFR de referencia^(24,25).

Desde el año 1994, se han ejecutado múltiples ensayos clínicos (EC) con el cetuximab, en los que se han tratado miles de pacientes con tumores de origen epitelial. Este AcM ha sido utilizado tanto en monoterapia como en combinación con RT o QT⁽²⁵⁾.

Bonner y col. realizaron y publicaron un ensayo de fase III. En el estudio, 424 pacientes con CCC loco-regional avanzado, fueron asignados aleatoriamente a un tratamiento con elevadas dosis de RT o a elevadas dosis de RT más cetuximab semanal. El grupo experimental mejoró significativamente el CLR y la mediana de supervivencia: 24,4 meses frente a 14,9 (p= 0,005) y 49,0 frente a 29,3 meses (p = 0,03) respectivamente, en comparación con la RT sola⁽²⁶⁾.

En un estudio de fase III conducido por *Eastern Cooperative Oncology Group*, en el cual se inscribieron 117 pacientes con CCECC recurrente o metastásico y que fueron asignados aleatoriamente para recibir cisplatino cada 4 semanas, con cetuximab semanal (grupo A) o placebo (grupo B). Se observó una tendencia al incremento tanto en la supervivencia libre de progresión (SLP) 4,2 meses frente a 2,7 meses, como en la SG, 9,2 meses frente a 8,0 meses, en el grupo A en comparación con el grupo B⁽²⁷⁾.

Merlano y col. evaluaron la terapia combinada de cetuximab con cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y RT en 45 pacientes, de ellos 38 presentaban enfermedad en estadio IV y 40 con afectación ganglionar. El criterio de valoración principal del estudio fue la tasa de respuesta completa (RC). La RC ocurrió en 32 pacientes (71 %)⁽²⁸⁾.

El cetuximab está aprobado por la FDA desde el 2006 para el tratamiento de pacientes con CCECC localmente avanzado, de forma concomitante con RT y desde el 2011 en pacientes con enfermedad recurrente y/o metastásica en combinación con QT basada en compuestos de platino teniendo en cuenta los resultados positivos de los EC y este esquema es considerado hasta la actualidad como el “estándar de oro” en el tratamiento de primera línea de estos pacientes^(29,30,31).

Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados expuestos anteriormente, también se ha constatado que sólo una minoría de los pacientes tratados se beneficia de la terapia con cetuximab y que el CCECC exhibe resistencia al tratamiento con este AcM, aspecto que plantea un desafío para su manejo clínico eficaz⁽³²⁻³⁴⁾.

La literatura refiere que la eficacia del tratamiento con cetuximab es baja, con una tasa de respuesta objetiva de un 13 % en monoterapia y un 36 % en combinación con QT. El tiempo hasta el fracaso del tratamiento, oscila alrededor de cinco meses en pacientes tratados con el régimen *EXTREME* (cetuximab/cisplatino/5-FU) aunque se mantenga la terapia con cetuximab⁽³²⁾.

Estos datos sugieren que el mecanismo de resistencia intrínseca y adquirida ha limitado considerablemente el beneficio clínico del cetuximab en el CCECC, por tal razón, la comprensión de los mecanismos moleculares de resistencia reviste enorme interés clínico en la actualidad y representa uno de los mayores desafíos en el tratamiento de esta enfermedad. Su conocimiento puede proporcionar indicaciones valiosas para la identificación de biomarcadores que pueden utilizarse en la práctica clínica para predecir la respuesta a estas terapias y de este modo seleccionar adecuadamente a los pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse con los AcM anti-EGFR, así como establecer nuevas opciones de tratamiento para reducir la resistencia^(32,33).

Mecanismos moleculares de resistencia al cetuximab en pacientes con CCECC

Braig y col. refieren un mecanismo específico de resistencia basado en la presencia de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) codificado como EGFR-K₅₂₁ o alelo K, que tiene un cambio de un aminoácido (arginina por lisina), en la posición 521 del dominio extracelular del receptor. Este polimorfismo es expresado en más del 40 % de los casos de CCECC y previamente había sido reportada su asociación con la respuesta reducida al cetuximab en una pequeña serie clínica de CCECC. En el estudio, los investigadores confirmaron este dato clínico en una cohorte de 59 pacientes VPH negativo con CCECC, en tratamiento paliativo con cetuximab en combinación con QT o RT, de los cuales, el 55,9 % fueron homo o heterocigotos para el alelo K y mostraron una SLP más reducida (mediana 4,93 meses; 95 % CI, 3,52–6,34) en comparación con los pacientes que no expresaron el alelo K (mediana 8,25 meses; 95 % CI, 3,25–13,26; P = 0,049)⁽³²⁾.

Además, se realizaron estudios en 12 líneas celulares de CCECC y detectaron que el cetuximab no inhibió significativamente la formación de colonias en las líneas celulares con una alta frecuencia de alelo K, lo que sugiere insensibilidad al cetuximab bajo condiciones *in vitro*, la cual fue también confirmada *in vivo* utilizando ratones con xenoinjertos de CCECC con expresión de EGFR-K₅₂₁. Los investigadores proponen que el polimorfismo EGFR-K₅₂₁ puede ser un potencial biomarcador predictivo de respuesta en el CCECC, pero que precisa de validación en estudios clínicos prospectivos⁽³²⁾.

Otro polimorfismo del cual se ha estudiado su posible asociación con la respuesta reducida al cetuximab en el CCECC es el AURKA (aurora quinasa A) Phe31-Ile. La AURKA es una proteína oncogénica y su función es participar en la división celular en los mamíferos. Este SNP implica la sustitución de timina por adenina en el codón 91 del gen STK15, lo que causa a su vez el cambio del aminoácido fenilalanina por isoleucina. Se ha demostrado que la variante 31Ile se amplifica preferentemente y está asociada con el grado de aneuploidía en tumores humanos⁽³⁵⁾.

Pickhard y col. desarrollaron un estudio donde comprobaron que las líneas celulares de CCECC homocigotas de tipo silvestre (Phe/Phe) respondieron al tratamiento en monoterapia con cetuximab, al mostrar una disminución significativa de la supervivencia clonogénica cuando eran tratadas con el AcM, mientras que las líneas celulares heterocigotas (Phe/Ile) no respondieron al tratamiento y demostraron ser resistentes al mismo. Los investigadores consideran que el estudio proporciona una evidencia *in vitro* del valor predictivo del polimorfismo AURKA Phe31-Ile en la eficacia del tratamiento con cetuximab⁽³⁵⁾.

Leblanc y col. realizaron una investigación en la cual fueron analizados 115 pacientes con CCECC tratados con cetuximab. De ellos, 77 con enfermedad recurrente y/o metastásica, tratados con cetuximab en primera línea (grupo 1) y 38 con tumores localmente avanzados, tratados con cetuximab y RT (grupo 2). La media de seguimiento fue de 54,1 meses (rango: 3,2–92,5 meses). En el grupo 1 la activación de puntos calientes de mutación en PIK3CA y KRAS/HRAS se correlacionó con una pobre SLP [mutaciones de PIK3CA (P=0,04), mutaciones en los genes RAS (P < 0,001), y todas las mutaciones juntas (PIK3CA o KRAS o HRAS; P = 0,002)]. En el grupo 2, se identificó que la pérdida de expresión de la proteína homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN) tendía a tener un impacto negativo en el pronóstico de los pacientes. Los investigadores también proponen que estos resultados deben ser validados adicionalmente en cohortes independientes teniendo en cuenta los regímenes de tratamiento⁽³³⁾.

Nair y col. encontraron que las mutaciones en el dominio extracelular del EGFR pueden causar señalización independiente del EGF, que conduce a una señalización sostenida de la proteína quinasa B (AKT) y resistencia al cetuximab⁽³⁶⁾. Por otro lado, Yonesaka y col. realizaron un estudio donde se examinó que la heregulina, ligando del receptor del factor de crecimiento epidémico 3 (HER3) de la misma familia que EGFR, estaba regulada en ascenso en las células con CCECC con resistencia adquirida al cetuximab, confiriéndoles supervivencia celular a través de la vía de señalización de AKT. Además, comprobaron que la eliminación de la heregulina en las células resistentes inhibía la fosforilación de HER3 y AKT y recuperaba la eficacia anticancerosa del cetuximab⁽³⁷⁾.

Wang y col. encontraron que el cetuximab indujo la activación de HER3 y la dimerización de HER2/HER3 en líneas celulares de CCECC y que el tratamiento combinado con cetuximab y MM-121 (seribantumab) bloqueaba las actividades de EGFR y HER3 e inhibía las vías de señalización de PI3K/AKT y ERK y el crecimiento celular de manera más eficaz que cuando se empleaba cada anticuerpo de manera individual⁽³⁸⁾.

Daly y col. demostraron que las proteínas de fusión FGFR3-TACC3 promueven la resistencia adquirida cuando se combinan bloqueadores de EGFR y HER3, por activación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK en células de CCECC⁽³⁹⁾. En otro estudio se demostró que las mutaciones de HRAS son bastante comunes en CCECC (9,44 %) y se asocian con una menor respuesta a la terapia con cetuximab⁽⁴⁰⁾.

Novoplansky y col. estudiaron un caso clínico de una paciente de 72 años con CCECC tratada con cetuximab en monoterapia, que desarrolló una respuesta inicial casi completa, seguida del desarrollo de resistencia adquirida. Los investigadores encontraron una amplificación y sobreexpresión sustancial de una proteína tirosina quinasa receptora, denominada MET y de su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en las células resistentes al cetuximab. También comprobaron que la estimu-

lación de MET en líneas celulares de CCECC fue suficiente para reactivar la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y conferir resistencia al cetuximab tanto *in vitro* como *in vivo* y que además la activación de la vía MET/MAPK elimina la regulación positiva de HER2/HER3 inducida por cetuximab⁽⁴¹⁾.

Brand y col. encontraron que AXL, un receptor tirosina quinasa, media la resistencia adquirida al cetuximab en CCECC a través de la señalización de MAPK y la activación posterior del EGFR y el factor de transcripción c-Jun⁽⁴²⁾. McDaniel y col. encontraron que la tirosina 821 de AXL media la resistencia al cetuximab mediante la activación de la proteína quinasa c-ABL en el CCECC y que la inhibición de la señalización de c-ABL resensibilizó a las células tumorales al AcM⁽⁴³⁾.

Boeckx y col. observaron que las células resistentes al cetuximab regulan positivamente varios genes, incluidos los de la interleucina-8 (IL-8), HB-EGF (factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina) y la metaloproteínasa ADAM19. Comprobaron además que estas células mostraron rasgos de transición epitelial a mesenquimal (EMT), al presentar mayor capacidad migratoria e invasiva, aumento de la expresión de la proteína mesenquimatosas, vimentina; así como la expresión de genes involucrados en la EMT⁽⁴⁴⁾. Hsu y col. corroboraron el papel de la EMT en la resistencia adquirida al cetuximab y encontraron que esta era inducida por la proteína SNAIL, un marcador mesenquimal⁽³⁴⁾.

Sen y col. identificaron una mayor activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en los tumores que reaparecieron después del tratamiento con cetuximab, en comparación con los que no recibieron tratamiento y que la inhibición de STAT3 disminuye el crecimiento de las líneas celulares con resistencia intrínseca o adquirida a la terapia anti-EGFR⁽⁴⁵⁾. En otro estudio, Wheeler y col. encontraron que EGFRvIII, una forma mutante de EGFR que confiere resistencia al cetuximab al presentar un dominio de unión al ligando truncado, indujo la migración e invasión de células de CCECC junto con un aumento de la activación de STAT3⁽⁴⁶⁾.

Nimotuzumab: el AcM anti-EGFR desarrollado en Cuba para el tratamiento del CCECC

En Cuba se emplea el nimotuzumab para el tratamiento del CCECC en estadios avanzados, en combinación con QRT o RT sola⁽⁴⁷⁾. El nimotuzumab es un AcM humanizado, inmunoglobulina de isotipo IgG1, desarrollado por el Centro de Inmunología Molecular de Cuba. Reconoce el EGFR con una afinidad intermedia al presentar una constante de disociación (KD) de $2,1 \times 10^{-8}$ mol / L^(47,48,49).

El nimotuzumab, al igual que el cetuximab, se une al dominio extracelular del EGFR y bloquea la interacción de sus dos principales ligandos endógenos. De esta forma inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor y se detiene el ciclo celular en la fase G1-S, con un marcado efecto anti-proliferativo. Además, ejerce un efecto antiangiogénico y proapoptótico en aquellos tumores que sobreexpresan el EGFR y reduce el número de células CD133+: células madre tumorales, responsables de la radiorresistencia⁽⁴⁸⁾. En estudios recientes se ha demostrado que el nimotuzumab activa las células asesinas naturales (NK), estimula la maduración de las células dendríticas e induce células T citotóxicas específicas contra EGFR. También, el AcM restaura la expresión del complejo principal de histocompatibilidad I (CMH-I) en las células tumorales, lo que dificulta una de las vías de escape inmunológico del EGFR^(11,49).

Desde 1998, se han concluido más de 50 EC en todo el mundo con nimotuzumab⁽¹¹⁾. El primer ensayo controlado inscribió a 106 pacientes con CCECC locorregionalmente avanzado, no aptos para recibir QRT concurrente. Los pacientes fueron aleatorizados para recibir RT más nimotuzumab o placebo. El criterio de valoración del ensayo fue la evaluación de la tasa de respuesta en ambos grupos. La tasa de RC fue de 59,5 % en la cohorte de nimotuzumab más RT frente al 34,2 % en el grupo control, diferencias estadísticamente significativas. La mediana de SG fue de 12,50 frente a 9,47 meses en el grupo experimental y control, respectivamente⁽⁵⁰⁾.

En un estudio controlado realizado en la India, 92 pacientes en estadio III/IVA fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: grupo A (RT frente a RT + nimotuzumab) y grupo B (QRT frente a QRT + nimotuzumab). Los sujetos recibieron 60–66 Gy en combinación con seis dosis de nimotuzumab semanales. La QT consistió en cisplatino, 50 mg /semanales durante seis semanas. En el grupo A, la respuesta antitumoral objetiva fue del 76 % en los sujetos que recibieron RT y nimotuzumab frente al 37 %, en

los pacientes que solo recibieron RT. En el grupo B, la tasa de CLR fue del 100 % en los pacientes que recibieron nimotuzumab más QRT frente al 70 % en los pacientes tratados con QRT⁽⁵¹⁾.

Después de un seguimiento a largo plazo, la tasa de supervivencia a cinco años fue del 39 % con RT + nimotuzumab frente al 26 % con RT sola ($p > 0,05$). La tasa de supervivencia fue del 57 % para el grupo de QRT+ nimotuzumab frente al 26 % para QRT sola ($p = 0,03$). El riesgo de muerte fue un 24 % menor si los pacientes recibieron RT + nimotuzumab en comparación con la RT sola, mientras que el riesgo de muerte fue 64 % menor con QRT + nimotuzumab en comparación con QRT⁽⁵²⁾.

Un estudio de fase III fue realizado en Mumbai (India), para evaluar el impacto de nimotuzumab más cisplatino/RT en la SLP, CLR, supervivencia libre de enfermedad (SLE) y SG. Fueron incluidos 536 sujetos, con confirmación de CCE de la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe, estadio III-IV y sin metástasis a distancia. Los pacientes fueron asignados a QT (cisplatino semanal 30 mg/m², 7 semanas) + RT (dosis total de 6.600–7.000 cGy) o al mismo tratamiento más nimotuzumab semanal (200 mg / dosis) para completar 7 dosis. En los sujetos que recibieron nimotuzumab + cisplatino/RT se apreció una SLP de 60,3 meses frente a 21 meses (grupo control) (HR 0,69; $p = 0,004$). La tasa de SLP a los 2 años fue de 61,8 % (grupo de nimotuzumab) frente a 50,1 % (grupo control). La SLE a dos años fue de 60,2 % (grupo de nimotuzumab) frente a 48,5 % (grupo control) (HR 0,71; $p = 0,008$). El CLR a dos años fue del 67,5 % (grupo de nimotuzumab) frente a 57,6 % (grupo control) (HR 0,67; $p = 0,006$). La SG a dos años fue de 63,8 % (grupo de nimotuzumab) frente a 57,7 % (grupo control)⁽⁵³⁾.

Los datos de los EC presentados anteriormente demuestran los resultados positivos obtenidos con el nimotuzumab en el tratamiento de los pacientes con CCECC, sin embargo, también evidencian que hay un grupo de pacientes que no responden a esta terapia y por consiguiente no reciben sus beneficios clínicos, razón por la cual, resulta imprescindible investigar por qué algunos pacientes responden bien a la terapia con nimotuzumab y en otros la tasa de respuesta no es la esperada y si este comportamiento puede estar relacionado con la existencia de mecanismos moleculares de resistencia a la terapia con este AcM.

Roca y col. publicaron un estudio en el cual se incluyeron 36 pacientes con CCECC en estadios avanzados inscritos en un EC fase IV. De estos, 14 recibieron tratamiento con nimotuzumab y RT, 14 fueron tratados con nimotuzumab combinado con RT y QT y a ocho se les aplicó el nimotuzumab solo. Al finalizar el estudio (tres años), el 100 % de los pacientes tratados con nimotuzumab en monoterapia o con nimotuzumab combinado con RT y QT estaban vivos, mientras que en el grupo de nimotuzumab con RT, de los 14 pacientes iniciales, solamente sobrevivieron cuatro. Los investigadores observaron que tanto la media de los parámetros hematológicos y de función hepática como la de otras variables del metabolismo se encontraron en el rango de referencia para cada una de las determinaciones antes del tratamiento y durante este y que, por tanto, no existieron diferencias significativas para los parámetros de laboratorio⁽⁵⁴⁾. Los resultados antes expuestos animan a plantear la siguiente interrogante: ¿Por qué los pacientes tratados con la combinación de nimotuzumab y RT tuvieron una menor supervivencia en comparación con el resto de los pacientes incluidos en el estudio que recibieron otros esquemas de tratamiento?

En este sentido la literatura refiere que las evidencias apuntan hacia la asociación entre la sobreexpresión del EGFR en células tumorales y el beneficio clínico de nimotuzumab en pacientes tratados, pues los estudios clínicos han demostrado que existe una correlación directa entre la elevada expresión del EGFR y la SG^(11,47).

Se ha planteado que los AcM con afinidades intermedias como el nimotuzumab pueden acumularse preferentemente en los tumores que muestran mayor expresión del EGFR, mientras que los anticuerpos con alta afinidad como es el caso del cetuximab reconocen tumores con menor expresión de la diana, pero también tejidos normales⁽¹¹⁾. Akashi y col. demostraron que la unión del nimotuzumab y la posterior inhibición de la fosforilación del EGFR solamente se detectaron en líneas de células tumorales con media o alta expresión del EGFR (10⁴ receptores por célula o más)⁽⁵⁵⁾, por otro lado, Garrido y col. observaron que la unión de los fragmentos Fab del nimotuzumab únicamente se detectó en la línea celular A431 (10⁶ receptores por célula), mientras que los fragmentos Fab del cetuximab también fueron identificados en las células tumorales con bajos niveles del EGFR⁽⁵⁶⁾.

En el EC de fase II realizado en pacientes con CCECC considerados no aptos para recibir QRT, la eficacia de nimotuzumab combinado con RT se comparó con RT más placebo. En un subconjunto de pacientes, la expresión del EGFR se evaluó mediante inmunohistoquímica. Los pacientes con tumores que expresaron altos niveles del EGFR y que recibieron nimotuzumab tuvieron una mejoría significativa en el tiempo medio de supervivencia en comparación con los pacientes del grupo placebo (16,5 frente a 7,2 meses, $p = 0,0038$) mientras que en aquellos pacientes cuyos tumores eran EGFR negativo no se observó una ventaja significativa del tratamiento con el AcM en comparación con el grupo placebo⁽⁵⁰⁾. Se observaron hallazgos similares en un EC de fase IIB en pacientes con CCECC sin tratamiento previo, que recibieron terapia estándar con o sin nimotuzumab. La expresión del EGFR tuvo una correlación significativa con la supervivencia en pacientes tratados con nimotuzumab y QRT ($p = 0,02$)⁽⁵⁷⁾.

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha considerado que para el nimotuzumab los pacientes con alta expresión del EGFR pueden obtener un mayor beneficio clínico y que esta característica puede ser un posible biomarcador predictivo de eficacia, pero que precisa de validación en EC prospectivos^(11,47). Paradójicamente para el cetuximab, que tiene la capacidad de conservar su eficacia incluso en aquellos tumores con baja expresión del EGFR⁽¹¹⁾, los niveles de expresión del receptor no parecen influir en la respuesta clínica diferencial mostrada por los pacientes, es por ello que la sobreexpresión tumoral del EGFR, al parecer, no es un biomarcador predictivo clínicamente útil en el CCECC. Los análisis realizados en grandes ensayos aleatorizados han revelado que no hay asociación entre el estado del EGFR determinado por inmunohistoquímica y el beneficio del cetuximab en estos tumores⁽⁵⁸⁾. Estas observaciones parecen indicar que, además de los niveles de expresión del EGFR, los resultados clínicos con la terapia anti-EGFR en el CCECC, pueden involucrar otros mecanismos moleculares y genéticos de extraordinaria complejidad y heterogeneidad que precisan ser investigados para el nimotuzumab.

Discusión

Los resultados de la revisión bibliográfica confirman el enorme interés que ha despertado la comprensión de la resistencia al tratamiento con cetuximab en el CCECC, al reportarse varios mecanismos moleculares de resistencia tanto intrínseca como adquirida al AcM.

Un mecanismo al cual se le ha prestado gran atención es la influencia del polimorfismo genético en la respuesta clínica diferencial mostrada por los pacientes tratados con cetuximab, tanto en el EGFR como a nivel de proteínas oncogénicas como la AURKA. La sobreexpresión de MET e inducción de la EMT por marcadores mesenquimales como SNAIL y la regulación positiva de varios genes como IL-8, HB-EGF y ADAM19, también han despertado gran interés. Las mutaciones en el dominio extracelular del EGFR, aunque han sido intensamente estudiadas, fueron las que arrojaron el menor número de publicaciones en la búsqueda realizada. Prevalcieron los estudios en los que se asoció la reducción de la eficacia del tratamiento con cetuximab con vías alternativas, que pueden incluir señales compensatorias de otros receptores de la familia EGFR, como HER3, así como otros mecanismos de resistencia relacionados con alteraciones moleculares en las vías de señalización: AKT/PI3K, RAS/RAF/MEK/ERK y JAK/STAT, particularmente las que involucran a las proteínas de la familia Ras, PIK3CA, PTEN y STAT3, así como el receptor tirosina quinasa AXL.

Con respecto al nimotuzumab, aparte de los hallazgos anteriormente expuestos, en la literatura disponible consultada no se encontraron otros estudios que aborden los posibles mecanismos que subyacen en la variabilidad de la respuesta clínica a la terapia con nimotuzumab en los pacientes con CCECC y si este comportamiento puede involucrar la presencia de mecanismos moleculares de resistencia, resultado que sugiere la necesidad de realizar más investigaciones en este sentido.

Conclusiones

La incorporación de terapias dirigidas al EGFR, como el cetuximab y nimotuzumab, han demostrado beneficio clínico en combinación con los tratamientos oncológicos clásicos. Sin embargo, los estudios clínicos evidencian que hay pacientes que presentan tasas de respuesta pobres o nulas con su uso.

En el caso del cetuximab la eficacia clínica ha sido considerada limitada; debido a que pueden estar implicados los mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida tales como: la presencia de los polimorfismos, EGFR-K₅₂₁ y AURKA Phe31-Ile, la activación de puntos calientes de mutaciones en PIK3CA y KRAS/HRAS y la pérdida de expresión de PTEN, entre otros. Aunque son múltiples las propuestas de biomarcadores que se publican, requieren su validación en EC prospectivos para que sean introducidos en la práctica clínica habitual y de este modo seleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse con estas terapias. Se sugiere la necesidad de incrementar los estudios sobre los mecanismos de resistencia al nimotuzumab.

Bibliografía

1. Semidey Raven ME. Evaluación de factores moleculares asociados a la respuesta a cetuximab: integración con tratamiento de radioterapia y quimioterapia en carcinoma escamoso de cabeza y cuello [tesis doctoral]. Departamento de Cirugía y Ciencias Morfológicas: Universitat Autònoma de Barcelona; 2016
2. Yan F, Knochelmann HM, Morgan PF, Kaczmar JM, Neskey DM, Graboyes EM, *et al*. The Evolution of Care of Cancers of the Head and Neck Region: State of the Science in 2020. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1543. DOI: 10.3390/cancers12061543
3. Robles Santos J, Pérez García T, Iznaga Marín N, Contreras PJ. Caracterización clínica del cáncer de cabeza y cuello. *Rev Cubana de Otorrinolaringol Cirug Cabeza Cuello [Revista en Internet]*. 2020; 4(1). [citado 16 septiembre 2020]; 4(1). Disponible en: <http://www.revotorrino.sld.cu/index.php/otl/article/view/128>
4. Registro Nacional de Cáncer de Cuba. Anuario de Incidencia de Cáncer en Cuba 2016. La Habana, Cuba: Ministerio de Salud Pública (MINSAP); 2020
5. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario Estadístico de Salud 2019. La Habana, Cuba: Ministerio de Salud Pública (MINSAP); 2020
6. Dhull AK, Atri R, Dhankhar R, Chauhan AK, Kaushal V. Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences. *World J Oncol*. 2018;9(3):80-84. DOI:10.14740/wjon1104w
7. Hutchinson MK ND, Mierzwa M, D'Silva NJ. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene*. 2020; 39(18): 3638–3649. DOI: 10.1038/s41388-020-1250-3
8. García Sevilla A. Tratamiento del cáncer de cabeza y cuello en estadio avanzado inoperable mediante quimioterapia intraarterial y radioterapia concomitante [tesis doctoral]. Departamento de Cirugía: Universidad Complutense de Madrid; 2018
9. Sociedad Española de Oncología Médica. Informe SEOM de evaluación de fármacos. Nivolumab en cáncer epidermoide de cabeza y cuello recurrente y/o metastásico tras progresión a platinos [Internet] [citado 18 diciembre 2020]. Disponible en: http://seom.org/seomcms/images/stories/Informes_SEOM/IPT_Nivolumab_cabeza_y_cuello.pdf
10. Economopoulou P, de Bree R, Kotsantis I, Psyri A. Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting. *Front Oncol*. 2019; 9:827. DOI: 10.3389/fonc.2019.00827
11. Crombet Ramos T, Mestre Fernández B, Mazorra Herrera Z, Iznaga Escobar N. Nimotuzumab for patients with inoperable cancer of head and neck. *Front Oncol*. 2020; 10:817. DOI: 10.3389/fonc.2020.00817
12. Gougis P, Moreau Bachelard C, Kamal M, Gan HK, Borcoman E, Torossian N, *et al*. Clinical Development of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JNCI Cancer Spectr*. 2019;3(4): pkz055. DOI: 10.1093/jncics/pkz055

- 13.** Tian Y, Lin J, Tian Y, Zhang G, Zeng X, Zheng R, *et al.* Efficacy and safety of anti-EGFR agents administered concurrently with standard therapies for patients with head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer.* 2018 ;142(11):2198-2206. DOI: 10.1002/ijc.31157
- 14.** Taberna M, Oliva M, Mesía R. Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2019; 9:383. DOI: 10.3389/fonc.2019.00383
- 15.** Eze N, Lee JW, Yang DH, Zhu F, Neumeister V, Sandoval-Schaefer T, *et al.* PTEN loss is associated with resistance to cetuximab in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2019; 91:69-78. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.02.026
- 16.** Moradi-Kalbolandi S, Hosseinzade A, Salehi M, Merikhian P, Farahmand L. Monoclonal antibody-based therapeutics, targeting the epidermal growth factor receptor family: from herceptin to Pan HER. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(7):841-854. DOI:10.1111/jphp.12911
- 17.** Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med.* 2019;51(1):1-14. DOI: 10.1038/s12276-018-0202
- 18.** Rehmani HS, Issaeva N. EGFR in head and neck squamous cell carcinoma: exploring possibilities of novel drug combinations. *Ann Transl Med.* 2020;8(13):813. DOI:10.21037/atm.2020.04.07
- 19.** Al Qaraghuli MM. Biotherapeutic Antibodies for the Treatment of Head and Neck Cancer: Current Approaches and Future Considerations of Photothermal Therapies. *Front Oncol.* 2020; 10:559596. DOI:10.3389/fonc.2020.559596
- 20.** Abu-Humaidan AHA, Ekblad L, Wennerberg J, Sørensen OE. EGFR modulates complement activation in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2020; 121. DOI: 10.1186/s12885-020-6615-z
- 21.** Argiris A, Harrington KJ, Tahara M, Schulten J, Chomette P, Ferreira Castro A, *et al.* Evidence-Based Treatment Options in Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Front Oncol.* 2017; 7:72. DOI: 10.3389/fonc.2017.00072.
- 22.** Vigneswara V, Kong A. Predictive biomarkers and EGFR inhibitors in squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). *Ann Oncol.* 2018; 29 (4): 794-796. DOI:10.1093/annonc/mdy065
- 23.** Szturz P, Vermorken JB. Immunotherapy in head and neck cancer: aiming at EXTREME precision. *BMC Med.* 2017;15(1):110. DOI: 10.1186/s12916-017-0879-4
- 24.** Díaz A, Lage A. Terapias con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico: acercando el futuro. *Biotechnol Apl.* 2007; 24 (1): 01-09
- 25.** Centro de Inmunología Molecular. Protocolo del ensayo clínico fase IV: Seguridad y efectividad del nimotuzumab en tumores de cabeza y cuello en estadios avanzados, de nuevo diagnóstico o recurrente; 2012
- 26.** Bonner J, Harari P, Giralt J, Azarnia N, Shin D, Cohen R, *et al.* Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2006; 354 (6):567-578. DOI: 10.1056/NEJ-Moa053422
- 27.** Burtness B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA; Eastern Cooperative Oncology Group. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8646-54. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.4646
- 28.** Merlano M, Russi E, Benasso M, Vitiello R, Violante S, Garrone O. Cisplatin-based chemoradiation plus cetuximab in locally advanced head and neck cancer: a phase II clinical study. *Ann Oncol.* 2011; 22 (3): 712-717. DOI: 10.1093/annonc/mdq412

- 29.** Lau A, Yang WF, Li KY, Su YX. Systemic Therapy in Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma- A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 153:102984. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102984
- 30.** Chapman C H, Saba NF, Yom SS. Targeting epidermal growth factor receptor for head and neck squamous cell carcinoma: still lost in translation? *Ann Transl Med.* 2016;4(4):80. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2016.01.01
- 31.** Łasińska I, Kolenda T, Teresiak A, Lamperska KM, Galus Ł, Mackiewicz J. Immunotherapy in Patients with Recurrent and Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(3):290-303. DOI: 10.2174/1871520618666180910092356
- 32.** Braig F, Kriegs M, Voigtlaender M, Habel B, Grob T, Biskup K, *et al.* Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancer is mediated by EGFR-K521 Polymorphism. *Cancer Res.* 2017; 77(5): 1188-1199
- 33.** Leblanc O, Vacher S, Lecerf C, Jeannot E, Klijanienko J, Berger F. Biomarkers of cetuximab resistance in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Med.* 2020; 17 (1): 208-217. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0153
- 34.** Hsu DS, Hwang WL, Yuh CH, Chu CH, Ho YH, Chen PB, *et al.* Lymphotoxin- β Interacts with Methylated EGFR to Mediate Acquired Resistance to Cetuximab in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4388-4401. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1955
- 35.** Pickhard A, Siegl M, Baumann A, Huhn M, Wirth M, Reiter R. The response of head and neck squamous cell carcinoma to cetuximab treatment depends on Aurora kinase A polymorphism. *Oncotarget.* 2014;5(14):5428-38. DOI: 10.18632/oncotarget.2117
- 36.** Nair S, Trummell HQ, Rajbhandari R, Thudi NK, Nozell SE, Warram JM, *et al.* Novel EGFR ectodomain mutations associated with ligand-independent activation and cetuximab resistance in head and neck cancer. *PLoS One.* 2020;15 (2): e0229077. DOI: 10.1371/journal.pone.0229077
- 37.** Yonesaka K, Tanaka K, Kitano M, Kawakami H, Hayashi H, Takeda M, *et al.* Aberrant HER3 ligand heregulin-expressing head and neck squamous cell carcinoma is resistant to anti-EGFR antibody cetuximab, but not second-generation EGFR-TKI. *Oncogenesis.* 2019;8 (10):54. DOI: 10.1038/s41389-019-0164-9
- 38.** Wang D, Qian G, Zhang H, Magliocca KR, Nannapaneni S, Amin AR, *et al.* HER3 Targeting Sensitizes HNSCC to Cetuximab by Reducing HER3 Activity and HER2/HER3 Dimerization: Evidence from Cell Line and Patient-Derived Xenograft Models. *Clin Cancer Res.* 2017;23(3):677-686. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0558
- 39.** Daly C, Castanaro C, Zhang W, Zhang Q, Wei Y, Ni M, *et al.* FGFR3-TACC3 fusion proteins act as naturally occurring drivers of tumor resistance by functionally substituting for EGFR/ERK signaling. *Oncogene.* 2017;36(4):471-481. DOI: 10.1038/onc.2016.216
- 40.** Rampias T, Giagini A, Siolos S, Matsuzaki H, Sasaki C, Scorilas A, *et al.* RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014; 20 (11): 2933-2946. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2721
- 41.** Novoplansky O, Fury M, Prasad M, Yegodayev K, Zorea J, Cohen L, *et al.* MET activation confers resistance to cetuximab, and prevents HER2 and HER3 upregulation in head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2019;145(3):748-762. DOI:10.1002/ijc.32170
- 42.** Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Luthar N, *et al.* AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res.* 2014; 74 (18):5152-5164. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0294
- 43.** McDaniel NK, Iida M, Nickel KP, Longhurst CA, Fischbach SR, Rodems TS, *et al.* AXL Mediates Cetuximab and Radiation Resistance Through Tyrosine 821 and the c-ABL Kinase Pathway in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(16):4349-4359. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3142

- 44.** Boeckx C, Blockx L, de Beeck KO, Limame R, Camp GV, Peeters M, *et al.* Establishment and characterization of cetuximab resistant head and neck squamous cell carcinoma cell lines: focus on the contribution of the AP-1 transcription factor. *Am J Cancer Res.* 2015;5(6):1921-38. PMID: 26269754
- 45.** Sen M, Joyce S, Panahandeh M, Li C, Thomas SM, Maxwell J, *et al.* Targeting Stat 3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18 (18): 4986-4996. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0792
- 46.** Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, *et al.* Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene.* 2010; 29 (37): 5135-5145. DOI: 10.1038/onc.2009.279
- 47.** Mazorra Z, Chao L, Lavastida A, Sanchez B, Ramos M, Iznaga N, *et al.* Nimotuzumab: beyond the EGFR signaling cascade inhibition. *Semin Oncol.* 2018; 45(1-2):18-26. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2018.04.008
- 48.** Viada C, Vega AM, Robaina M, Frías A, Álvarez M, Santiesteban Y, *et al.* Evaluación de Nimotuzumab para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello: Meta-análisis de ensayos controlados. *Bionatura.* 2020; 5 (1): 56-62. DOI: 10.21931/RB/2020.05.01.8
- 49.** Mazorra Z, Lavastida A, Concha-Benavente F, Valdés A, Srivastava RM, García-Bates TM, *et al.* Nimotuzumab induces NK cell activation, cytotoxicity, dendritic cell maturation and expansion of egfr-specific cells in head and neck cancer patients. *Front Pharmacol.* 2017; 8:382. DOI: 10.3389/fphar.2017.00382
- 50.** Rodríguez MO, Rivero TC, del Castillo Bahi R, Muchuli CR, Bilbao MA, Vinageras EN, *et al.* Nimotuzumab plus radiotherapy for unresectable squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biol Ther.* 2010;9(5):343-9. DOI: 10.4161/cbt.9.5.10981
- 51.** Ramakrishnan MS, Eswaraiah A, Crombet T, Piedra P, Saurez G, Iyer H, *et al.* Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin. *MABs.* 2009; 1(1):41-8. DOI: 10.4161/mabs.1.1.7509
- 52.** Reddy BK, Lokesh V, Vidyasagar MS, Shenoy K, Babu KG, Shenoy A, *et al.* Nimotuzumab provides survival benefit to patients with inoperable advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized, open-label, phase IIb, 5-year study in Indian patients. *Oral Oncol.* 2014; 50 (5):498-505. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.008
- 53.** Patil VM, Noronha V, Joshi A, Agarwal J, Ghosh-Laskar S, Budrukkar A, *et al.* A randomized phase 3 trial comparing nimotuzumab plus cisplatin chemoradiotherapy versus cisplatin chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer. *Cancer.* 2019.125(18):3184-97. DOI: 10.1002/cncr.32179
- 54.** Roca Serra L, Céspedes Quevedo MC, Ricardo Cobas MC, Serra Pérez L, Vinent Céspedes AM. Características humorales de los tumores de cabeza y cuello en pacientes tratados con nimotuzumab. *MEDISAN [Internet].* 2018 [citado 26 Sep 2020]; 22(5): 470-476. Disponible en:
- 55.** http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192018000500003&lng=es
- 56.** Akashi Y, Okamoto I, Iwasa T, Yoshida T, Suzuki M, Hatashita E, *et al.* Enhancement of the antitumor activity of ionising radiation by nimotuzumab, a humanised monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in non-small cell lung cancer cell lines of differing epidermal growth factor receptor status. *Br J Cancer.* 2008; 98 (4):749-55. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604222
- 57.** Garrido G, Tikhomirov IA, Rabasa A, Yang E, Gracia E, Iznaga N, *et al.* Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile. *Cancer Biol Ther.* 2011; 11 (4):373-82. DOI: 10.4161/cbt.11.4.14097
- 58.** Basavaraj C, Sierra P, Shivu J, Melarkode R, Montero E, Nair P. Nimotuzumab with chemoradiation confers a survival advantage in treatment-naïve head and neck tumors over expressing EGFR. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(7):673-81. DOI: 10.4161/cbt.10.7.12793

59. Saba NF, Chen ZG, Haigentz M, Bossi P, Rinaldo A, Rodrigo JP, *et al.* Targeting the EGFR and Immune Pathways in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (SCCHN): Forging a New Alliance. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(11):1909-1915. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0214

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.21614

Artículos de revisión

Consecuencias derivadas de la automedicación con benzodiacepinas en personas adultas: revisión exploratoria

Consequences derived from self-medication with benzodiazepines in adults: scoping review

Cristina Cantos-Azorín¹  0000-0002-9023-7735

Javier Sanz-Valero^{2,3}  0000-0002-8735-0075

¹Universidad Miguel Hernández, Facultad de Farmacia. Campus Sant Joan d'Alacant, Alicante, España.

²Universidad Miguel Hernández, Departamento de Salud Pública e Historia de la Ciencia, Campus Sant Joan d'Alacant, Alicante, España.

³Instituto de Salud Carlos III, Escuela Nacional de Medicina del Trabajo, Área de Divulgación e Investigación y Servicios, Madrid, España.

Correspondencia

Javier Sanz-Valero
fj.sanz@isciii.es

Recibido: 10.04.2021

Aceptado: 21.06.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación

Conflicto de intereses

La autora y el autor declaran la inexistente de conflicto de interés.

Resumen

Introducción: Revisar la evidencia científica sobre las consecuencias derivadas de la automedicación con benzodiazepinas (BZD) en personas adultas.

Método: Revisión exploratoria de los artículos recuperados de las bases de datos MEDLINE (PubMed), Embase, Cochrane Library, Scopus y Web of Science hasta octubre de 2020. La búsqueda se formuló mediante los descriptores “Self Medication” y “Benzodiazepines”, utilizando los Entry Terms relacionados y los filtros: «Humans» y «Adult: 19+years». La calidad de los artículos se evaluó mediante STROBE.

Resultados: De las 388 referencias recuperadas, tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron 14 artículos. Las puntuaciones STROBE oscilaron entre mínimo de 8,7 y máximo de 17,7, con mediana de 14,3. En 8 artículos se estudió la automedicación; en 2 el abuso; en otros 2 la automedicación o el abuso con la finalidad de tratar las emociones, el estrés o, directamente, drogarse. Otros resultados fueron la sobredosificación y el consumo previo y posterior de BZD al ingreso en programa de metadona.

Conclusiones: Los artículos revisados reportaron elevada prevalencia de automedicación y auto-manipulación de BZD. Es necesario conocer el patrón de uso en cada grupo poblacional para establecer medidas que garanticen una adecuada prescripción y uso racional. Mejorando la atención farmacéutica en el proceso de dispensación de BZD (alertando sobre las consecuencias de un tratamiento crónico y la exclusividad de las recetas) y la validación farmacéutica (detección de prescripciones inadecuadas), se podría actuar contra la automedicación de las BZD y las consecuencias derivadas.

Palabras clave: Automedicación; Benzodiazepinas; Trastornos Relacionados con Sustancias; Programas de Monitoreo de Medicamentos Recetados; Medicamentos bajo Prescripción.

Abstract

Introduction: To review the scientific evidence on the consequences of self-medication with benzodiazepines (BZD) in adults.

Method: Exploratory review of the articles retrieved from the bibliographic databases MEDLINE (PubMed), Embase, Cochrane Library, Scopus and Web of Science until October 2020. The search query was formulated using the descriptors “Self Medication” and “Benzodiazepines”, also using the related Entry Terms and filters: «Humans» and «Adult: 19+years». The quality of the articles was evaluated using the STROBE questionnaire.

Results: From the 388 references retrieved, after applying the inclusion and exclusion criteria, 14 articles were selected. Once the articles were evaluated by means of the STROBE questionnaire for this review the scores ranged from a minimum of 8.7 to a maximum of 17.7, with median equal to 14.3. Self-medication was studied in 8 articles; overuse was researched in 2 of them; 2 other articles' aim was to examine self-medication or overuse with the purpose of treating emotions, stress or, directly, using them as drug. Other observed outcomes were overdose, in addition to their previous and subsequent consumption to joining the methadone program.

Conclusions: The revised articles have documented a high prevalence of self-medication and self-manipulation of BZD. It is essential to know the use pattern of each population branch in order to establish measures which guarantee both suitable prescription and rational use. By improving pharmaceutical care in the process of dispensing BZD (warning of the effects of chronic treatment and the exclusivity of prescriptions) and pharmaceutical validation (detection of unsuitable prescriptions) BZD self-medication and its derived consequences could be actively prevented.

Keywords: Self Medication; Benzodiazepines; Substance-Related Disorders; Prescription Drug Monitoring Programs; Prescription Drugs.

Puntos clave

Las benzodiazepinas son consumidas, por un alto número de personas, sin una adecuada prescripción médica. La atención farmacéutica puede favorecer el adecuado uso de estos medicamentos los cuales están sujetas a altas tasas de automedicación.

Introducción

Las benzodiazepinas (BZD), constituyen un grupo farmacológico conocido y de amplia prescripción desde su aparición en la década de los 60, del siglo XX, como sucesores de los barbitúricos. Se trata de un grupo de fármacos que comparte sus efectos farmacológicos ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes, miorelajantes así como de inducir amnesia anterógrada. Y, como era de esperar, también comparten sus potenciales efectos adversos y tóxicos, los cuales se vinculan con la posología y duración de tratamiento⁽¹⁾.

Las BZD han sido, y continúan siendo, los fármacos de elección para el tratamiento de los desórdenes de la ansiedad y el insomnio. Debido a esto, son de los fármacos más prescritos en el mundo⁽²⁾.

Hoy en día, se cuestiona la correcta utilización de este grupo farmacológico, debido al enorme abuso que se realiza de los mismos, fundamentalmente para el tratamiento de la ansiedad e insomnio, donde se recomienda una duración del tratamiento de 2 a 4 semanas en insomnio y de 8 a 12 semanas en ansiedad, incluyendo en ambos casos la retirada gradual, tiempo que se excede en la mayoría de los casos, llegando incluso a convertirse en un tratamiento crónico en algunos pacientes⁽³⁾. Además, el uso de medicamentos por iniciativa propia, sin consulta previa al médico (la automedicación), es una problemática que acompaña al abuso de las BZD⁽⁴⁾.

Además, y a pesar de los conocimientos actuales sobre una mayor sensibilidad a los efectos secundarios en los ancianos, que debería conducir a una mayor precaución, solo un tercio de las prescripciones de BZD, en este grupo de edad, se consideran apropiadas. Las situaciones impropias más frecuentes son la duración y/o dosificación excesiva de una prescripción médica o la automedicación, especialmente en un contexto en el que estaría contraindicado, por ejemplo, BZD de acción prolongada en ancianos⁽⁵⁾.

De acuerdo con el informe mundial, emitido por la Organización Mundial de la Salud en 2019⁽⁶⁾, las BZD son una de las tres sustancias más utilizadas en varios países y su uso sin prescripción médica ocupa el primer lugar, siendo Sudamérica una de las regiones donde existe un mayor consumo de BZD, situación confirmada por la Organización de los Estados Americanos que emitió un informe en el 2019 respecto al consumo de drogas en América donde se indica que las BZD eran uno de los tranquilizantes más usados en la región⁽⁷⁾.

En España, se ha demostrado que hasta en un 82,5 % de los casos se excede la duración del tratamiento, hecho que lleva a pensar que nos encontramos ante una adicción invisible, llegando incluso a ser cuestionadas por algunos investigadores, pues su consumo a largo plazo conlleva dependencia en la mayoría de los pacientes, siendo muy frecuente la automedicación entre la población⁽⁸⁾. Según el informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios⁽⁹⁾, publicado en 2014, sobre la utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos, en España durante el periodo 2000-2012, se observó un incremento sostenido del 2 % al 3 % anual, con excepción de los años 2004 y 2006, en los que el incremento fue del 6 % y 5 % respectivamente y los años 2008 y 2011 que fueron los que experimentaron un mayor incremento en el consumo de toda la serie (7 % y 8 % respectivamente).

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue revisar la evidencia científica sobre las consecuencias derivadas de la automedicación con benzodiazepinas en personas adultas.

Métodos

Diseño

Estudio descriptivo transversal y análisis crítico de los trabajos recuperados mediante revisión sistemática.

La estructura de la presente revisión siguió la guía de comprobación para revisiones sistemáticas *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (PRISMA)⁽¹⁰⁾.

Fuente de obtención de los datos

Los datos se obtuvieron de la consulta directa y acceso, vía Internet, a las siguientes bases de datos bibliográficas del ámbito de las ciencias de la salud: MEDLINE (vía PubMed), Embase, Cochrane Library, Scopus y Web of Science.

Tratamiento de la información

Para definir los términos de la búsqueda se consultó el Thesaurus desarrollado por la U.S. National Library of Medicine. Se consideró adecuado el uso de los términos “Self Medication” y “Benzodiazepines”, como descriptores y como texto en los campos de registro del título y el resumen, conformando la sintaxis de búsqueda final mediante la intersección booleana de dos ecuaciones: (Ecuación 1) AND (Ecuación 2).

- Ecuación 1 - Automedicación:

“Self Medication”[MeSH] OR “Self Medication”[Title/Abstract]

- Ecuación 2 Benzodiazepinas:

“Benzodiazepines”[MeSH] OR “Benzodiazepines”[Title/Abstract] OR “Benzodiazepine”[Title/Abstract] OR “Benzodiazepin”[Title/Abstract] OR “Benzodiazepin Derivative”[Title/Abstract] OR “Benzodiazepinones”[Title/Abstract]

La ecuación de búsqueda final se desarrolló para su empleo en la base de datos MEDLINE, vía PubMed, utilizando los filtros: «Humans» y «Adult: 19+ years».

Esta estrategia se adaptó a las características de cada una del resto de bases de datos consultadas. La búsqueda se realizó desde la primera fecha disponible, de acuerdo a las características de cada base de datos, hasta octubre de 2020 y se completó con el examen del listado bibliográfico de los artículos que fueron seleccionados.

Selección final de los artículos

Se escogieron para la revisión y análisis crítico los artículos que cumplieron los siguientes criterios de selección: ser artículo original que se ajuste a los objetivos del estudio (automedicación con benzodiazepinas), estar escritos en inglés, castellano o portugués y estar publicados en revistas arbitradas por pares.

Se excluyeron: los artículos que no se pudieron obtener a texto completo, que no existiera relación causal entre la intervención y el resultado (automedicación con benzodiazepinas y estudio del suceso) y que no se realizara en personas adultas.

La elección de los artículos pertinentes se realizó de forma independiente por los autores: CCA y JSV. Para dar por válida la inclusión de los estudios se estableció que la valoración de la concordancia entre estos autores (índice Kappa) debía ser superior al 60 % (fuerza de la concordancia buena). Siempre que se cumpliera esta condición, las posibles discordancias se solucionaron mediante el consenso entre los autores⁽¹¹⁾.

La calidad de los artículos seleccionados se valoró utilizando como apoyo las pautas para informar los estudios observacionales STROBE (*STrengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*)⁽¹²⁾, que contiene una lista de 22 puntos de control esenciales que deben describirse durante la

publicación de estos documentos. Para cada artículo seleccionado, se asignó un punto por cada ítem presente (en caso de no ser aplicable, no puntuaba). Cuando un ítem estaba compuesto por varios puntos, estos se evaluaron de forma independiente, dándole el mismo valor a cada uno de ellos y posteriormente se realizó un promedio (siendo éste el resultado final de ese ítem), de tal forma que en ningún caso se pudiera superar la valoración total de un punto por ítem.

Para conocer el nivel de evidencia y su grado de recomendación se utilizaron las recomendaciones de la *U. S. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ)*⁽¹³⁾.

Extracción de los datos

El control de la corrección de los datos se realizó mediante dobles tablas que permitieron la detección de las desviaciones y su subsanación mediante nueva consulta de los originales.

Para determinar la actualidad de los artículos se calculó el semiperíodo de Burton-Kebler (la mediana de la edad) y el Índice de Price (porcentaje de artículo con edad inferior a los 5 años).

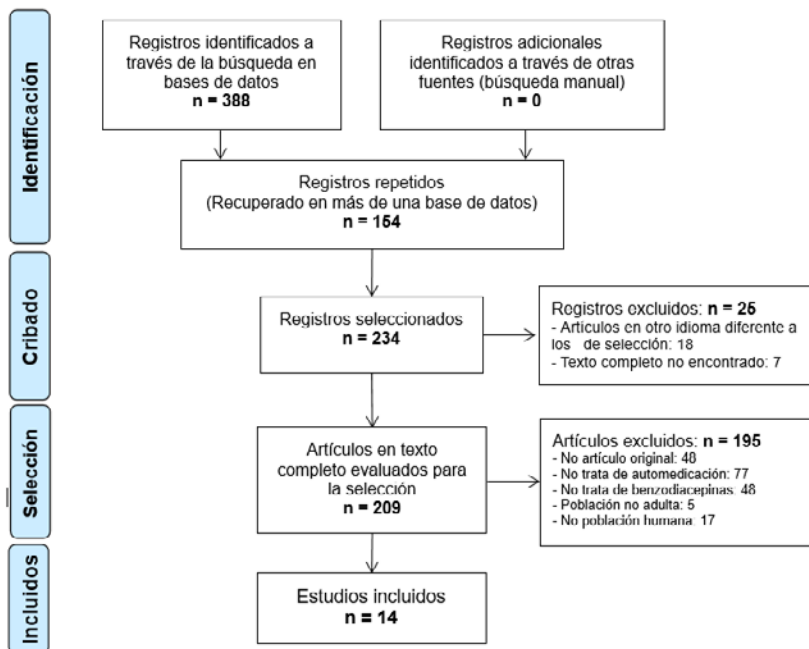
Los estudios se agruparon según las variables a estudio, con el fin de sistematizar y facilitar la comprensión de los resultados, considerando los siguientes datos: primer autor y año de publicación, diseño del estudio, población incluida en los artículos, país, periodo de implementación de la intervención, la intervención y el resultado principal obtenido en el estudio.

Resultados

Al aplicar los criterios de búsqueda se recuperaron un total de 388 artículos: 82 (21,1 %) en MEDLINE (vía PubMed), 44 (11,3 %) en Embase, 9 (2,3 %) en Cochrane Library, 122 (31,4 %) en Scopus y 131 (33,8 %) en Web of Science. No encontrándose ningún documento mediante búsqueda manual en los listados bibliográficos de los artículos seleccionados.

Tras depurar los 154 registros repetidos, aplicar los criterios de inclusión y exclusión (figura 1), fue posible seleccionar 14 artículos⁽¹⁴⁻²⁷⁾, para su revisión y análisis crítico, ver tabla 1.

Figura 1 – Identificación y selección de estudios



El acuerdo sobre la pertinencia de los estudios seleccionados, entre los dos evaluadores, calculado mediante el índice Kappa fue del 100 %.

Los artículos elegidos presentaron una obsolescencia, según el Índice de Burton-Kebler, igual a 13 años, con un Índice de Price del 14,3 %. El año con mayor número de trabajos publicados fue el 2011, con 3 publicaciones⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Al evaluar la calidad de los artículos seleccionados para la revisión, mediante el cuestionario STROBE, las puntuaciones oscilaron entre mínimo de 8,7 (41,4 % cumplimiento) y máximo de 17,70 (84,3 % cumplimiento) con mediana igual a 14,3 (tabla 2).

El diseño de los 14 trabajos revisados fue descriptivo, por lo que según los criterios de la AHRQ esta revisión presentó evidencia III (procede de estudios observacionales bien diseñados) con grado de recomendación C.

Tabla 1. Resumen de los estudios revisados sobre las consecuencias derivadas de la automedicación con benzodiazepinas en personas adultas

| Primer autor y año | Diseño | Población | País | Idioma | Periodo | Intervención | Resultado principal |
|---|-------------------------------------|--|---------|------------------|--|---|---|
| Murphy, et al. 2018 ⁽¹⁴⁾ | Descriptivo transversal | N total = 13 H/M = 11/2 Edad = entre 18 y 25 años | Irlanda | Inglés | Entre junio de 2012 y abril de 2013 | Explorar las experiencias de los jóvenes que abusan con altas dosis de benzodiazepinas. | Los participantes informaron que usaban benzodiazepinas (BZD) para evitar efectos negativos emocionales y factores estresantes diarios. |
| Rubio González, et al. 2016 ⁽¹⁵⁾ | Descriptivo transversal | N total = 1.814 H/M = 638/1176 Edad = entre 15 y 54 años | España | Español | Entre el 1 de enero de 2009 y el 31 de diciembre de 2013 | En las urgencias hospitalarias relacionadas con el consumo de hipnosedantes | El diagnóstico más frecuente fue sobredosis/intento autolítico con BZD (29,3 %), siendo lorazepam la más consumida. En el 23,3 % de los casos se consumió más de un hipnosedante y el 9 % se asoció a trastornos psiquiátricos. |
| Caro-Mantilla, et al. 2013 ⁽¹⁶⁾ | Descriptivo transversal prospectivo | N total = 93 H/M = 38/55 Edad = mayores de 60 años | España | Español e inglés | Entre junio y diciembre de 2006 | Caracterizar el uso inadecuado de psicofármacos. | Los psicofármacos más consumidos fueron las BZD, principalmente por automedicación. |

| Primer autor y año | Diseño | Población | País | Idioma | Periodo | Intervención | Resultado principal |
|--|-------------------------|--|----------------|---------|--|--|--|
| Chen, et al. 2011 ⁽¹⁷⁾ | Descriptivo transversal | N total = 194 H/M = 110/84 Edad = media de 46,6 años y mediana de 47 años | Estados Unidos | Inglés | Entre diciembre de 2009 y julio de 2010 | Estimar la prevalencia del uso indebido de BZD en un programa de metadona y proporcionar información sobre las características de los consumidores de BZD comparándolos con los no consumidores. | La mitad de los consumidores de BZD (54 %) comenzaron a utilizarlas después de ingresar en el programa de metadona. El 61 % de los que las consumían previamente, aumentaron o reanudaron el uso después de ingresar en el programa. |
| Khan, et al. 2011 ⁽¹⁸⁾ | Descriptivo transversal | N total = 700 H/M = 0/700 Edad = entre 15 y 45 años | Pakistán | Inglés | Entre agosto y noviembre de 2006 | Conocer el patrón de uso de BZD en enfermeras. | 97 enfermeras (14 %) usaban BZD, de las cuales 71 (73 %) por automedicación. |
| Klemenc-Ketis, et al. 2011 ⁽¹⁹⁾ | Descriptivo transversal | N total = 1195 H/M = 270/925 Edad = media de 22,4 años | Eslovenia | Inglés | Entre el 20 de marzo y el 8 de abril de 2008 | Determinar la incidencia de automedicación en estudiantes universitarios y determinar los patrones de automedicación según el género. | Más mujeres (94,8 %) que hombres (87,8 %) utilizaron BZD en automedicación |
| Marin, et al. 2010 ⁽²⁰⁾ | Descriptivo transversal | N total = 4017 H/M = 2.089/1.928 Edad = media de 23,6 años (\pm 5,2 años) | Argentina | Inglés | En septiembre de 2008 | Establecer la frecuencia de automedicación y la prevalencia del consumo de drogas ilícitas en estudiantes universitarios. | El 6,9 % consumió BZD, de los cuales el 39 % fue por automedicación. |
| Divac, et al. 2004 ⁽²¹⁾ | Descriptivo transversal | N total = 1800 H/M = 716/1.084 Edad = media de 58 años | Serbia | Inglés | Entre 1990 y 2001 | Investigar el consumo y el patrón de uso de las BZD. | La utilización de BZD aumentó en la década anterior a la realización del estudio, lo que indica una tendencia a la automedicación. |
| Silva Herrera, et al. 2002 ⁽²²⁾ | Descriptivo transversal | N total = 804 H/M = 212/592 Edad = más de 15 años | Cuba | Español | Entre noviembre de 1999 y enero de 2000 | Estimar la prevalencia del uso crónico de BZD entre los pacientes que acuden a los servicios de atención primaria. | La automedicación fue detectada en el 25,1 % de los consumidores crónicos de BZD. |

| Primer autor y año | Diseño | Población | País | Idioma | Periodo | Intervención | Resultado principal |
|--|--------------------------|---|-------------|---------|--|---|--|
| Segura Nogueira, et al. 2000 ⁽²³⁾ | Descriptivo longitudinal | N total = 243 H/M = 80/163 Edad = media de 84 años | España | Español | Mayo de 1999 | Valorar el consumo de psicofármacos en los pacientes crónicos domiciliarios. | El 8 % de los pacientes que refirió consumir psicofármacos lo hacía por automedicación. El grupo farmacológico más consumido fueron las BZD, en un 64 %. |
| Gelkopf, et al. 1999 ⁽²⁴⁾ | Prospectivo | N total = 213 H/M = no consta Edad = no consta | Israel | Inglés | En 1993 | Estudio de los patrones de prevalencia y el curso del abuso de BZD en pacientes en tratamiento de mantenimiento con metadona. | Más de la mitad de los pacientes abusó de BZD durante el primer mes de tratamiento. Algunos pacientes se automedicaban con BZD para tratar sus problemas emocionales y otros para “drogarse”. El flunitrazepam fue la más utilizada en automedicación. |
| Kouyanou, et al. 1997 ⁽²⁵⁾ | Descriptivo transversal | N total = 125 H/M = 46/79 Edad = media de 41 años (entre 18 y 65 años) | Reino Unido | Inglés | No consta | Prevalencia del uso, mal uso, abuso y dependencia de medicamentos en pacientes con dolor crónico. | El 18 % usaba BZD. Se observaron tasas bajas de uso indebido (4,8 %), abuso (4 %) y dependencia (3,2 %) de BZD. |
| Ochs, et al. 1988 ⁽²⁶⁾ | Descriptivo transversal | N total = 223 H/M = 93/130 Edad = media de 45 años (entre 13 y 81 años) | Alemania | Inglés | Entre diciembre de 1979 y abril de 1980. | Determinar el uso real de BZD midiendo concentraciones plasmáticas. | Se detectó diazepam y flurazepam en 10 pacientes que no tenían prescritas BZD. |
| Ladewig 1983 ⁽²⁷⁾ | Descriptivo transversal | N total = 180 H/M = 47/125 Edad = ± 45 años | Suiza | Inglés | Entre 1980 y 1981 | Conocer las causas y consecuencias por lo una determinada población muestra un abuso aislado de BZD. | 172 pacientes mostraron abuso aislado de BZD. |

Tabla 2. Análisis de la calidad metodológica de los estudios a través de los 22 puntos de valoración de la guía STROBE

| Artículo | Puntuación de los ítems del cuestionario ^a | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | TOTAL | %b |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|-----|-----|----|-----|----|----|----|----|----|----|-------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | | |
| Murphy, et al. ⁽¹⁴⁾ | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | NA | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 9 | 42,9 % |
| Rubio González et al. ⁽¹⁵⁾ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | NA | 0,6 | 0,5 | 1 | 0,6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 17,7 | 84,3 % |
| Caro-Mantilla et al. ⁽¹⁶⁾ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | NA | 0,3 | 0,5 | 1 | 0,6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 15,4 | 73,3 % |
| Chen, et al. ⁽¹⁷⁾ | 0,5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | NA | 0,6 | 0,5 | 1 | 0,3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 16,9 | 80,5 % |
| Khan, et al. ⁽¹⁸⁾ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | NA | 0,3 | 0,5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11,8 | 56,2 % |
| Klemenc-Ketis, et al. ⁽¹⁹⁾ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | NA | 0,3 | 0,5 | 1 | 0,3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 16,1 | 76,7 % |
| Marin, et al. ⁽²⁰⁾ | 0,5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | NA | 0,6 | 0,5 | 1 | 0,3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 14,9 | 71 % |
| Divac, et al. ⁽²¹⁾ | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | NA | 0,3 | 0,5 | 1 | 0,3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 16,1 | 76,7 % |
| Silva Herrera, et al. ⁽²²⁾ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | NA | 0,3 | 0,5 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 12,8 | 61 % |
| Segura Noguera, et al. ⁽²³⁾ | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | NA | 0,6 | 0,5 | 1 | 0,3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 15,4 | 73,3 % |
| Gelkopf, et al. ⁽²⁴⁾ | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | NA | 0,3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11,3 | 53,8 % |
| Kouyanou, et al. ⁽²⁵⁾ | 0,5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | NA | 0,3 | 0,3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 11,1 | 52,9 % |
| Ochs, et al. ⁽²⁶⁾ | 0,5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | NA | 0,6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 13,1 | 62,4 % |
| Ladewig ⁽²⁷⁾ | 0,5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | NA | 0,6 | 0,6 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 8,7 | 41,4 % |

a - 0 = no cumple el ítem ni ninguna de sus partes; 1 = cumple el ítem en su totalidad; 0 a 1 = Cumple parcialmente el ítem; NA = no aplica

b - Porcentaje de cumplimiento del total de ítems, excluyendo los que no aplican (NA).

La filiación de los trabajos incluidos en la revisión fue española, con 3 trabajos^(15,16,23), siendo el resto de filiaciones irlandesa⁽¹⁴⁾, estadounidense⁽¹⁷⁾, paquistaní⁽¹⁸⁾, eslovena⁽¹⁹⁾, argentina⁽²⁰⁾, serbia⁽²¹⁾, cubana⁽²²⁾, israelí⁽²⁴⁾, británica⁽²⁵⁾, alemana⁽²⁶⁾ y suiza⁽²⁷⁾.

Los trabajos aceptados en esta revisión estuvieron redactados mayoritariamente en inglés, en 10 ocasiones^(14,17-21,24-27), y en 3 lo fue en castellano^(15,22,23); 1 artículo fue redactado de forma bilingüe (castellano/inglés)⁽¹⁶⁾.

La población incluida en los trabajos recopilados en esta revisión osciló entre un mínimo de 13 personas⁽¹⁴⁾ y un máximo de 4017⁽²⁰⁾, situándose el rango de la edad entre 13 y 84 años. Si bien la revisión se centró en población adulta y ello era uno de los criterios de exclusión, se aceptaron 3 artículos que incluyendo esta población la edad inicial se estableció en los 15 años^(15,18,22) y el estudio de Ochs et al.⁽²⁶⁾, que incluyó personas a partir de los 13 años.

Se comprobó que los estudios revisados presentaban una adecuada relación hombre/mujer, si bien en el trabajo de Gelkopf et al.⁽²⁴⁾ no se informaba sobre la separación, según sexo, de la población.

El periodo temporal que presentaron los estudios osciló entre 1 mes, mayo de 1999 en el artículo de Segura Noguera et al.⁽²³⁾ y septiembre de 2008 en el de Marin et al.⁽²⁰⁾, y 11 años, entre 1990 y 2001, correspondiente al estudio de Divac et al.⁽²¹⁾. El trabajo de Kouyanou et al.⁽²⁵⁾ no indicó el periodo de la intervención.

Intervenciones observadas

De los 14 estudios analizados en esta revisión, 8 (57,1 %) realizaron acciones para estudiar el uso o abuso de benzodiazepinas^(14,17,18,21,22,24,26,27); 2 (14,2 %) trabajos se centraron en la automedicación^(19,20). Pero, ningún artículo relacionó ambas intervenciones conjuntamente.

La intervención de 6 estudios (42,9 %) se centraron en las prevalencias de uso^(17,20,22,24–26); uno de ellos de los medicamentos en general⁽²⁵⁾, otro de drogas ilícitas⁽²⁰⁾ y los 4 restantes de las BZD exclusivamente^(17,22,24,26).

Así mismo, 3 (21,4 %) artículos realizaron acciones para conocer los patrones de comportamiento^(18,19,21); 2 de ellos en relación con el patrón de uso de BZD^(18,21) y otro de automedicación⁽¹⁹⁾.

Por otro lado, 2 (14,3 %) trabajos estudiaron el abuso de BZD^(14,27) y 3 (21,4 %) investigaron el uso de psicofármacos e hipnosedantes de forma general^(15,16,23).

Resultados principales obtenidos en la revisión de los artículos seleccionados

En el resultado principal de todos los estudios revisados se centró en las BZD. En 8 (57,1 %) de ellos^(16,18–23,26), se estudió la automedicación; en 2 (14,3 %) ^(25,27), el tema investigado fue el abuso; en otros 2 (14,3 %) ^(14,24), el objetivo fue conocer la automedicación o el abuso con la finalidad de tratar las emociones, el estrés o, directamente, drogarse.

Otros resultados observados fueron el estudio de sobredosificación⁽¹⁵⁾ y el consumo previo y posterior de las mismas al ingreso en programa de metadona⁽¹⁷⁾.

Discusión

La revisión realizada muestra la existencia de trabajos que evidencian las consecuencias derivadas de la automedicación con benzodiazepinas en personas adultas.

La obsolescencia de los documentos revisados presentó una mayor antigüedad a lo previsto para el área de las ciencias de la salud⁽²⁸⁾ e incluso en el ámbito de la producción científica sobre farmacia⁽²⁹⁾. Si bien, en este último campo del conocimiento existen trabajos bibliométricos que presentan una mayor obsolescencia⁽³⁰⁾. Así pues, la baja actualidad observada y el escaso número de artículos encontrados mostró la necesidad de una actualización del tema a estudio. Esta afirmación vino refrendada por la fecha de publicación de la última revisión sistemática que versó sobre el objetivo revisado, indizada en MEDLINE, que data del año 2017⁽³¹⁾. Aunque, dicha revisión se centró en el uso de las BZD y no exclusivamente en la automedicación.

La evaluación de la calidad de los estudios incluidos en este trabajo, mediante STROBE, no resultó muy elevada, aunque análoga a la observada en otras revisiones anteriores. De todos modos, no se eliminó ningún estudio dado el bajo número de ellos y a la búsqueda de una mayor información que recogiera la relación causal estudiada, situación ya mencionada en anteriores revisiones sistemáticas^(32,33).

El diseño de los estudios revisados mostró una moderada evidencia y grado de recomendación, según la clasificación de la *U. S. Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ). El optar por el diseño observacional se debió a la búsqueda de una consistente relación causa–efecto, ya que se buscaban trabajos de intervención⁽¹³⁾. En consecuencia, se encontró un predominio de los trabajos con diseño descriptivo transversal, método de estudio apropiado para el objetivo de la revisión realizada (automedicación por Benzodiazepinas).

Era predecible la filiación anglófona de una mayoría de artículos y que estuvieran redactados, principalmente, en lengua inglesa, este idioma es el elegido para la publicación de la mayoría de los artículos ya que hacerlo en otra lengua distinta resulta negativo para la visibilidad. Asimismo, el número de revistas anglófonas contenidas en las principales bases de datos bibliográficas es muy elevado y publicar en ellas facilita la citación^(29,30). No obstante, en esta revisión es destacable el número de trabajos redactados en castellano,

La población a estudio mostró gran heterogeneidad, tanto en la muestra a estudio como en la edad de las personas estudiadas. Es cierto que la revisión se enfocó a población adulta y al final fueron incluidas personas a partir de los 13 años. Pero, como ya se indicó anteriormente, no se eliminó ningún estudio con el fin de obtener la máxima información posible. Además, del Informe del Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) se pudo conocer que el inicio del consumo de BZD en los adolescentes está alrededor de los 14 años, lo cual constituye una conducta de riesgo, considerando la inmadurez neurológica y psicológica de los jóvenes, el potencial adictivo de las benzodiazepinas y sus consecuencias neuropsicológicas. Sin embargo, no de forma frecuente, está extendido el uso de BZD entre los adolescentes. Los padres son la principal fuente de suministro (cuando se trata de automedicación), seguido de la prescripción médica. En ambos casos utilizadas con fines terapéuticos. Aun así, una minoría las obtiene del mercado ilegal y las utiliza con fines no terapéuticos⁽³⁴⁾.

Es necesario idear formas de educar de manera factible a los pacientes adolescentes y a sus padres, sobre los posibles riesgos tanto del uso no médico como del uso indebido con fines médicos de ansiolíticos y medicamentos para dormir. Se debería de realizar una evaluación del uso de sustancias antes de prescribir un medicamento controlado; si la evaluación es positiva, el paciente debe ser monitoreado de cerca mientras usa ansiolíticos o medicamentos para dormir. La prescripción de un ansiolítico o medicación para dormir durante un mayor número de años durante la adolescencia se asocia con mayores probabilidades de uso no médico⁽³⁵⁾.

La relación hombre/mujer fue adecuada teniendo en cuenta que las BZD son las únicas sustancias adictivas que son más consumidas por mujeres que por hombres⁽³⁶⁾. Matizar que las BZD están indicadas principalmente en el manejo de síntomas de ansiedad e insomnio, y utilizadas con mayor frecuencia en mujeres, en relación con la prescripción de BZD en la población general⁽³¹⁾.

En cuanto al período de seguimiento resultó adecuado para valorar los resultados de la intervención, requisito que cumplieron la mayoría de los estudios seleccionados. Se consideró necesario un período mínimo de varias semanas para poder valorar los resultados derivados de la automedicación. En la mayoría de los casos, las personas que recurren a las BZD de forma abusiva lo hacen durante un tiempo prolongado, incluso durante años (36). Aparte, hay que tener en cuenta que se recomienda una duración del tratamiento de 2 a 4 semanas en insomnio y de 8 a 12 semanas en ansiedad, incluyendo en ambos casos la retirada gradual^(3,37).

Es importante destacar las intervenciones realizadas para el estudio de la automedicación con BZD. En este sentido, Maletzky y Klotter⁽³⁸⁾, señalaron que la mayoría de las personas tratadas ajustaron su propia dosis, aproximadamente la mitad la aumentó y se observó que el diazepam fue susceptible de auto-manipulación porque al igual que otras sustancias adictivas, como anfetaminas o alcohol, produce efectos positivos inmediatos. Las personas que tomaron dosis más altas y durante más tiempo fueron más susceptibles de desarrollar tolerancia. En consecuencia, la automedicación es una opción que no debería contemplarse nunca. El uso prolongado de BZD conlleva riesgo de tolerancia, dependencia y efectos secundarios que pueden ser graves. Por tanto, existen pautas de uso racional que deben conocerse al realizar su prescripción, siendo la mejor medida preventiva la prescripción de esta medicación durante un período limitado, informando al paciente desde el inicio de la duración del tratamiento, así como de los efectos adversos de su utilización a largo plazo⁽¹⁾.

Opalaye et al.⁽³⁹⁾, concluyeron que los médicos deberían avisar, a sus pacientes, que la receta es solo para la persona mencionada y que existen riesgos en caso de poner la receta a disposición de otros miembros de la familia. Los farmacéuticos también podrían tener un papel importante en la prevención del uso no prescrito de estas sustancias, no solo informando a los usuarios sobre la exclusividad

de la prescripción, sino también sobre el cuidado que se debe tener en cuanto al almacenamiento y eliminación de medicamentos en el hogar.

Para ayudar a prevenir el abuso y la desviación de sedantes, Weaver⁽⁴⁰⁾ propuso que los prescriptores deberían tomar las precauciones adecuadas, similares a las que se usan al prescribir otras sustancias controladas, como los opioides. Esto incluiría conocer los registros médicos anteriores (historia clínica) o el utilizar un programa de monitoreo de medicamentos psicotrópicos recetados. La adecuada prescripción es el origen en el control del abuso de estas sustancias.

Es conocido el aumento sustancial del uso ambulatorio de las BZD. A la luz de las crecientes tasas de efectos adversos abusos que implican a las BZD, entender y abordar los patrones de prescripción puede ayudar a frenar el uso creciente de estas sustancias⁽⁴¹⁾. A pesar de los riesgos asociados con su uso, las BZD se siguen utilizando de forma más generalizada que prudente. En este contexto, parece esencial comprender mejor cómo sus patrones de uso pueden asociarse con sus posibles efectos adversos⁽⁴²⁾. El tratamiento prolongado con BZD es una práctica común a pesar de las recomendaciones clínicas de uso a corto plazo. Así, después de un uso prolongado, a menudo es difícil suspender las BZD debido a la dependencia psicológica y fisiológica⁽⁴³⁾.

Posibles limitaciones al estudio: La principal limitación sería el escaso número de estudios recuperados que impidió tener una clara evidencia entre la intervención estudiada. Asimismo, la moderada evidencia y grado de recomendación obtenida, pero que es coherente con el tema revisado que, obviamente, solo se puede basar en estudios observacionales.

Por otro lado, las bases de datos de Scopus y Web of Science recuperaron muchos trabajos que finalmente fueron irrelevantes, lo que podría deberse a la falta de indexación (la búsqueda se realizó en formato de texto consultando el título, el resumen y las palabras clave) y la imposibilidad de limitar la búsqueda por tipo de artículo (restringido a ensayos clínicos). Este alto “ruido” de documentos también se observó en otras recientes revisiones sistemáticas^(32,44).

Por todo lo anteriormente expuesto, se podría concluir: Los resultados descriptivos de los estudios seleccionados: actualidad, diseño, población, filiación y periodo estudiado son acordes al tema a estudio. Los artículos revisados reportaron una elevada prevalencia de automedicación y auto-manipulación de BZD. Es necesario conocer el patrón de uso en cada grupo poblacional para establecer medidas que garanticen una adecuada prescripción y uso racional. Mejorando la atención farmacéutica en el proceso de dispensación de BZD (alertando sobre las consecuencias de un tratamiento crónico y la exclusividad de las recetas) y la validación farmacéutica (detección de prescripciones inadecuadas), se podría actuar contra la automedicación de las BZD y las consecuencias derivadas.

Bibliografía

1. Domínguez V, Collares M, Ormaechea G, Tamosiunas G. Uso racional de benzodiazepinas: hacia una mejor prescripción. *Rev Urug Med Interna*. 2016;1(3):14-24.
2. Busto UE. Factores de riesgo en el abuso y la dependencia a benzodiazepinas. *Trastor Adict*. 2000;2(3):177-82.
3. Guina J, Merrill B. Benzodiazepines I: Upping the Care on Downers: The Evidence of Risks, Benefits and Alternatives. *J Clin Med*. 2018;7(2):e17. DOI: 10.3390/jcm7020017
4. Prasad SB. Self Medication and their consequences: A challenge to health professional. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016;9(2):314-7.
5. Airagnes G, Pelissolo A, Lavallée M, Flament M, Limosin F. Benzodiazepine Misuse in the Elderly: Risk Factors, Consequences, and Management. *Curr Psychiatry Rep*. 2016;18(10):89. DOI: 10.1007/s11920-016-0727-9
6. The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2019*. Vienna, Austria: United Nations; 2019.

- 7.** Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), Organización de los Estados Americanos (OEA). Informe sobre el Consumo de Drogas en las Américas 2019. Washington DC, USA: CICAD, OEA; 2019.
- 8.** Rodríguez Sánchez V. Una adicción invisible: Práctica de prescripción y representaciones sociales del consumo de benzodiazepinas desde el enfoque de género [tesis doctoral]. Elche, España: Universidad Miguel Hernández; 2017.
- 9.** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España durante el periodo 2000-2012 [Internet]. Madrid, España: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2014 [citado 14 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://bit.ly/3aaFIQ8>
- 10.** Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000097. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000097
- 11.** Wanden-Berghe C, Sanz-Valero J. Systematic reviews in nutrition: standardized methodology. *Br J Nutr.* 2012;107(Suppl 2):S3-S7. DOI: 10.1017/S0007114512001432
- 12.** von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Gac Sanit.* 2008;22(2):144-50. DOI: 10.1157/13119325
- 13.** Berkman ND, Lohr KN, Ansari M, McDonagh M, Balk E, Whitlock E, et al. Grading the Strength of a Body of Evidence When Assessing Health Care Interventions for the Effective Health Care Program of the Agency for Healthcare Research and Quality: An Update. En: Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ), editor. *Methods Guide for Effectiveness and Comparative Effectiveness Reviews* [Internet]. Rockville, USA: AHRQ; 2008 [citado 14 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47095/>
- 14.** Murphy KD, Lambert S, McCarthy S, Sahn LJ, Byrne S. «You Don't Feel»: The Experience of Youth Benzodiazepine Misuse in Ireland. *J Psychoactive Drugs.* 2018;50(2):121-8. DOI: 10.1080/02791072.2017.1371365
- 15.** Rubio González V, Redondo Martín S, Ruíz López Del Prado G, Muñoz Moreno MF, Velázquez Miranda A. Hospital Emergencias Associated with the Consumption of Hypnotics and Sedatives, 2009-2013, Castilla y León, Spain. *Rev Esp Salud Publica.* 2016;90:e1-12.
- 16.** Caro-Mantilla M, Apolinaire-Pennini J, González-Menéndez R. Uso inadecuado de psicofármacos en las personas de 60 años y más. *Revista Finlay* [revista en Internet]. 2013 [citado 14 de diciembre de 2020]; 3(1):[aprox. 9 p.]. Disponible en: <http://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/174>.
- 17.** Chen KW, Berger CC, Forde DP, D'Adamo C, Weintraub E, Gandhi D. Benzodiazepine use and misuse among patients in a methadone program. *BMC Psychiatry.* 2011;11:90. DOI: 10.1186/1471-244X-11-90
- 18.** Khan SA, Farooq S, Bano A. Pattern of Benzodiazepine use in Nurses. *Gomal J Med Sci.* 2011;9(1):28-31.
- 19.** Klemenc-Ketiš Z, Hladnik Z, Kersnik J. A cross sectional study of sex differences in self-medication practices among university students in Slovenia. *Coll Antropol.* 2011;35(2):329-34.
- 20.** Marín GH, Cañas M, Carlson S, Silvestrini MP, Corva S, Mestorino N, et al. Self-Medication, Substance Abuse and Alcohol Consumption in Students Attending to La Plata National University, Argentina. *Lat Am J Pharm.* 2010;29(8):1425-30.
- 21.** Divac N, Jasović M, Djukić L, Vujnović M, Babić D, Bajcetić M, et al. Benzodiazepines utilization and self-medication as correlates of stress in the population of Serbia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2004;13(5):315-22. DOI: 10.1002/pds.940
- 22.** Silva Herrera S, Vergara Fabián E, Yera Alós I, Freijoso E. Utilización de benzodiazepinas en la Atención Primaria de Salud. *Rev Cubana Med Gen Integ.* 2002;18(3):1-5.

23. Segura Noguera JM, Barreiro Montaña MC, Bastida Bastús N, Collado Gastalver D, González Solanelas M, Linares Juan de Sentmenat C, et al. Home chronic illness and consumption of psychopharmaceuticals. *Aten Primaria*. 2000;26(9):620-3. DOI: 10.1016/s0212-6567(00)78734-8
24. Gelkopf M, Bleich A, Hayward R, Bodner G, Adelson M. Characteristics of benzodiazepine abuse in methadone maintenance treatment patients: a 1 year prospective study in an Israeli clinic. *Drug Alcohol Depend*. 1999;55(1-2):63-8. DOI: 10.1016/s0376-8716(98)00175-6
25. Kouyanou K, Pither CE, Wessely S. Medication misuse, abuse and dependence in chronic pain patients. *J Psychosom Res*. 1997;43(5):497-504. DOI: 10.1016/s0022-3999(97)00171-2
26. Ochs HR, Miller LG, Greenblatt DJ, Shader RI. Actual versus reported benzodiazepine usage by medical outpatients. *Eur J Clin Pharmacol*. 1987;32(4):383-8. DOI: 10.1007/BF00543974
27. Ladewig D. Abuse of benzodiazepines in western European society--incidence and prevalence, motives, drug acquisition. *Pharmacopsychiatry*. 1983;16(4):103-6. Doi: 10.1055/s-2007-1017458
28. Bernabeu-Martínez MA, Sanz Valero J. Análisis bibliométrico y temático de la producción científica existente en la base de datos bibliográfica MEDLINE sobre medicamentos peligrosos en las Unidades de Hospitalización a Domicilio. *Hosp Domic*. 2018;2(3):101-15. DOI: 10.22585/hospdomic.v2i3.50
29. Sanz-Valero J, Tomás-Gorriz V, Morales-Suárez-Varela M. Estudio bibliométrico de la producción científica publicada por la revista *Ars Pharmaceutica* en el periodo 2001 a 2013. *Ars Pharm*. 2014;55(2):1-10.
30. Urios López R, Sanz-Valero J. Efectos adversos asociados al uso de anabolizantes en deportistas: revisión sistemática. *Ars Pharm*. 2018;59(1):45-55.
31. Gómez S, León T, Macuer M, Alves M, Ruiz S. Benzodiazepine use in elderly population in Latin America. *Rev Med Chil*. 2017;145(3):351-9. DOI: 10.4067/S0034-98872017000300009
32. Sánchez-Moya J, Sanz-Valero J, Lopez-Pintor E. Intervenciones desde la farmacia comunitaria en los pacientes adultos que reciben atención de la salud a domicilio: revisión exploratoria. *Hosp Domic*. 2020;4(4):209-27. DOI: 10.22585/hospdomic.v4i4.113
33. Troncoso-Piñeiro P, González de Giarratana AE, Rivadulla-Lema I, Torres-Romero MG, Sanz-Valero J. Neoplasias en trabajadores expuestos al aluminio y/o sus compuestos: Revisión sistemática. *Med Segur Trab*. 2018;64(252):312-26.
34. Pedersen W, Lavik NJ. Adolescents and benzodiazepines: prescribed use, self-medication and intoxication. *Acta Psychiatr Scand*. 1991;84(1):94-8. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1991.tb01427.x
35. Boyd CJ, Austic E, Epstein-Ngo Q, Veliz PT, McCabe SE. A prospective study of adolescents' nonmedical use of anxiolytic and sleep medication. *Psychol Addict Behav*. 2015;29(1):184-91. DOI: 10.1037/adb0000026
36. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). Informe 2020: Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España [Internet]. Madrid, España: Ministerio de Sanidad; 2020 [citado 8 de enero de 2021]. Disponible en: <https://bit.ly/2L4Gi84>
37. Klerman HR, Ciraulo DA, Zindel LR. *Clinical Manual of Addiction Psychopharmacology*. Washington DC, USA: American Psychiatric Publishing; 2014.
38. Maletzky BM, Klotter J. Addiction to diazepam. *Int J Addict*. 1976;11(1):95-115. DOI: 10.3109/10826087109045533
39. Opaleye ES, Noto AR, Sanchez ZM, Amato TC, Locatelli DP, Gossop M, et al. Nonprescribed use of tranquilizers or sedatives by adolescents: a Brazilian national survey. *BMC Public Health*. 2013;13:499. DOI: 10.1186/1471-2458-13-499
40. Weaver MF. Prescription Sedative Misuse and Abuse. *Yale J Biol Med*. 2015;88(3):247-56.
41. Agarwal SD, Landon BE. Patterns in Outpatient Benzodiazepine Prescribing in the United States. *JAMA Netw Open*. 2019;2(1):e187399. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2018.7399

- 42.** Mathieu C, Joly P, Jacqmin-Gadda H, Wanneveich M, Bégaud B, Pariente A. Patterns of Benzodiazepine Use and Excess Risk of All-Cause Mortality in the Elderly: A Nationwide Cohort Study. *Drug Saf.* 2021;44(1):53-62. DOI: 10.1007/s40264-020-00992-7.
- 43.** Baandrup L, Ebdrup BH, Rasmussen JØ, Lindschou J, Gluud C, Glenthøj BY. Pharmacological interventions for benzodiazepine discontinuation in chronic benzodiazepine users. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;3(3):CD011481. DOI: 10.1002/14651858.CD011481.pub2
- 44.** Gea Cabrera A, Sanz-Lorente M, Sanz-Valero J, López-Pintor E. Compliance and Adherence to Enteral Nutrition Treatment in Adults: A Systematic Review. *Nutrients.* 2019;11(11):e2627. DOI: 10.3390/nu11112627

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.21463

Artículos de revisión

¿Reducen las estatinas el riesgo de glaucoma? revisión de las evidencias

Do statins reduce the risk of glaucoma? review of the evidences

Laura Pastor¹  0000-0002-5863-2786

Maria Alvarez-Sotomayor¹  0000-0001-8466-1698

¹Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Departamento Farmacología, Sevilla, España.

Correspondencia

Maria Alvarez de Sotomayor
aldesoto@us.es

Recibido: 04.06.2021

Aceptado: 02.09.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación

Conflicto de intereses

Ninguno

Resumen

Introducción: Los objetivos de este trabajo son revisar y resumir los datos publicados hasta el momento que relacionen el uso de estatinas con el riesgo de aparición o de agravamiento de glaucoma y plantear una hipótesis que explique los efectos protectores de las estatinas y su asociación con un menor riesgo de glaucoma.

Método: se realizó una revisión en PubMed usando los términos “*statins, hmg coa*” o “*hmg coa inhibitors*” y “*glaucoma*” o “*open angle glaucoma*” o “*intraocular pressure*”. Se seleccionaron todos los artículos que incluían estudios clínicos o meta-análisis y se excluyeron comentarios, cartas a editor, artículos retractados e investigación en modelos animales. Todos los artículos fueron posteriores a 2004. Se emplearon en la revisión 17 artículos.

Resultados: la mayor parte de los estudios muestran un efecto protector de las estatinas frente a la aparición y agravamiento del glaucoma de ángulo abierto. Sin embargo, otros estudios no llegan a encontrar una relación significativa e incluso alguno muestra una relación entre el glaucoma y el empleo de estatinas a altas dosis. Los efectos neuroprotectores y la inhibición de la Rho-quinasa podrían explicar los efectos encontrados.

Conclusiones: la evidencia publicada no es suficiente como para recomendar el tratamiento con estatinas con el objetivo de prevenir el avance o la aparición del glaucoma.

Palabras clave: estatinas; inhibidores HMG-Coenzima A; glaucoma.

Abstract

Introduction: The objectives of this article are to review and summarize the updated published data that show the relation between treatment with statins and the incidence and progression of glaucoma. We also aimed to pose a hypothesis to explain the protective effects of statins and its association with glaucoma risk.

Method: a review of the literature was carried out in the PubMed database considering the MeSH terms “*statins, hmg coa*” or “*hmg coa inhibitors*” and “*glaucoma*” or “*open angle glaucoma*” or “*intraocular pressure*”. All articles including clinical studies and meta-analysis were selected. Comments, letters to editors, retracted articles and research on animal models were excluded. All the articles were published from 2004. 17 articles were finally selected for review.

Results: most of the studies showed a protective effect of statins on incidence or progression of open angle glaucoma. Nevertheless, other studies did not find a significant association and even one study found association between statin treatment at high doses and more incidence of glaucoma. Neuroprotective effects of statin and inhibition of Rho-kinase may help explain the described effects.

Conclusions: The published results are not enough evidence to support statin recommendation as preventive treatment for the incidence or progression of glaucoma.

Keywords: statins; hmg coa inhibitors; glaucoma

Puntos clave

Las estatinas son los fármacos hipolipemiantes más empleados en el mundo. Diferentes estudios observacionales muestran cómo estos fármacos pueden ser capaces de reducir el riesgo de aparición o agravamiento de glaucoma de ángulo abierto. Los efectos pleiotrópicos de las estatinas pueden explicar estas observaciones. Destacan la neuroprotección asociada a un aumento del óxido nítrico y la mejora del flujo del humor acuoso a través de la malla trabecular consecuencia de la inhibición de la Rho-quinasa. Sin embargo, la evidencia no es concluyente, ya que parte de los estudios publicados muestran un resultado neutro o incluso un mayor riesgo de glaucoma. La recomendación terapéutica de estatinas como tratamiento preventivo del glaucoma requeriría estudios más robustos y a ser posible, ensayos clínicos.

Introducción

Los inhibidores de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) reductasa, o estatinas, se consideran actualmente los medicamentos hipolipemiantes más importantes. Se usan para reducir los niveles séricos de colesterol en pacientes con dislipidemia y para la prevención primaria y secundaria de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares^(1,2).

Las estatinas son inhibidores competitivos y reversibles de la enzima HMG-CoA reductasa y por tanto inhiben la síntesis de colesterol. Esta reducción produce una estimulación de la síntesis de receptores de LDL y su expresión en los hepatocitos y, por lo tanto, se reducen los niveles de LDL. Producen, igualmente, una cierta disminución de la concentración plasmática de triglicéridos y un aumento de las HDL⁽³⁾.

Se ha demostrado que esta clase de medicamentos ejercen efectos beneficiosos independientemente de sus propiedades hipolipemiantes, efectos a los que llamamos pleiotrópicos, y que son beneficiosos para reducir la progresión de la aterosclerosis y que pueden ayudar a explicar la disminución de la mortalidad que produce su empleo⁽⁴⁾. El mecanismo que explica estos efectos está relacionado con la menor producción de metabolitos intermediarios en la ruta biosintética del colesterol, responsables de la isoprenilación y regulación de la actividad de las proteínas Rho y Rac⁽⁵⁾. Precisamente, la Rho quinasa, se ha mostrado una diana farmacológica de utilidad para el tratamiento del glaucoma, ya que la inhibición de esta enzima produce cambios en la morfología de las células trabeculares, en las uniones intercelulares e inhibe la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina, y como consecuencia consigue una mejoría en la salida de humor acuoso⁽⁶⁾.

El glaucoma es una neuropatía óptica crónica, progresiva y multifactorial caracterizada por cambios estructurales en la cabeza del nervio óptico y pérdida del campo visual, a menudo en presencia de presión intraocular (PIO) elevada^(1,7). Es la principal causa de ceguera irreversible y hay estimaciones de que podría llegar a afectar a 112 millones de personas para 2040⁽⁸⁾. Su prevalencia es de 1,5 a 2% en mayores de 40 años y aumenta hasta el 4% en mayores de 70 años. Estas cifras indican la necesidad de identificar tratamientos, con el objetivo de prevenir su aparición, así como la disminución de su progresión⁽⁷⁾.

La causa de esta enfermedad es la disminución del drenaje del humor acuoso a través de la malla trabecular y el consecuente aumento de la PIO hasta valores nocivos que producen un deterioro de las células ganglionares de la retina y, por tanto, una pérdida de la visión⁽⁷⁾. La forma más común es el glaucoma de ángulo abierto (GAA), que se caracteriza por su evolución lenta, progresiva y asimétrica y que presenta alteraciones morfológicas de la papila, capa de fibras nerviosas de la retina y alteraciones campimétricas en presencia de un ángulo abierto⁽⁹⁾. Prácticamente no hay síntomas al inicio y, como consecuencia, aproximadamente la mitad de los casos permanecen sin diagnosticar hasta la aparición de cuadros avanzados en los que las alteraciones del campo visual se hacen evidentes, pudiendo evolucionar a ceguera en las fases finales. Por esta razón, la detección y tratamiento en las etapas iniciales es esencial para limitar la discapacidad visual⁽⁹⁾.

El principal factor de riesgo para el desarrollo y la progresión del glaucoma es la PIO. Además, es el único factor modificable⁽¹⁰⁾. Los tratamientos existentes se centran exclusivamente en la reducción de la PIO hasta niveles normales mediante la utilización de medicamentos, láser y/o cirugía para así prevenir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, puede que la enfermedad progrese a pesar de la disminución de la PIO, por lo que, el descubrimiento de otras estrategias terapéuticas para el glaucoma, representaría un gran avance en el tratamiento de una enfermedad que puede limitar severamente la calidad de vida del paciente.

Actualmente, existen estudios que han demostrado efectos beneficiosos de las estatinas en una variedad de enfermedades oculares⁽¹⁾. Crecientes datos clínicos han sugerido que las estatinas pueden tener un efecto protector contra el desarrollo y la progresión del GAA, aunque existe controversia por la falta de unanimidad de los resultados publicados. Los objetivos de este trabajo son revisar y resumir los datos clínicos y evidencias publicados hasta el momento que relacionen el uso de estatinas con el riesgo de aparición o de agravamiento de glaucoma y plantear una hipótesis que explique los efectos protectores de las estatinas y su asociación con un menor riesgo de glaucoma.

Métodos

Se realizó una búsqueda avanzada en la base de datos Medline a través del motor de búsqueda PubMed empleando los términos “*statins*, *hmg coa*” y “*glaucoma*” como encabezados de temas médicos (MeSH Terms). La búsqueda arrojó como resultado 30 artículos, que fueron revisados para comprobar si se correspondían con estudios clínicos (casos-controles, cohortes y ensayos clínicos) o con meta-análisis. Se excluyeron 15 artículos: 1 por haberse retractado los autores, 5 por tratarse de comentarios o cartas omentando otros artículos, 3 por tratarse de revisiones sin datos o análisis originales, 3 por ser datos preclínicos obtenidos en modelos animales o en células y 2 por no estar relacionados con el objetivo del trabajo. Quedaron seleccionados 15 artículos.

Se completó la búsqueda con los términos “*statins*, *hmg coa*” y “*open angle glaucoma*”, encontrando 15 artículos (todos ya seleccionados). El empleo del término “*hmg coa inhibitors*” en lugar de “*statins*, *hmg coa*” arrojó como resultado los mismos 30 artículos anteriormente encontrados. También se introdujeron los términos “*statins*, *hmg coa*” e “*intraocular pressure*”, que mostraron 24 artículos. Una vez eliminados los duplicados, se añadieron 2 artículos a la revisión, que por tanto, se basará en 17 artículos.

Todos los artículos seleccionados habían sido publicados desde el año 2004 en adelante. No fue necesario establecer ningún filtro de fecha de publicación.

Resultados

Los trabajos revisados fueron estudios observacionales de casos y controles y estudios de cohortes. Tan solo se encuentra publicado un pequeño ensayo clínico con 12 pacientes cuyo objetivo no fue evaluar el riesgo de glaucoma sino la circulación retiniana, aunque también valoró presión intraocular⁽¹¹⁾. También se encontró un meta-análisis de los resultados observacionales publicados hasta 2016⁽¹²⁾. Algunos de los estudios, además de estatinas, incluyeron en su objetivo el análisis del efecto de diferente medicación sistémica sobre la aparición de glaucoma⁽¹³⁻¹⁸⁾. Aunque la mayoría de los trabajos publicados mostraron un efecto protector de las estatinas, no todos llegaron a la misma conclusión. A continuación, resumimos los datos revisados y los clasificamos en función de que mostraran una protección frente al glaucoma, ningún efecto o incluso un mayor riesgo de glaucoma asociado al tratamiento con estatinas.

Estudios que muestran un efecto protector de las estatinas

La primera referencia publicada sobre el efecto de las estatinas sobre la aparición del glaucoma es un estudio retrospectivo publicado por McGwin et al. en 2004⁽¹⁹⁾. Se trata de un estudio de casos y controles en el que se incluyeron pacientes varones mayores de 50 años de un hospital de veteranos.

Las mujeres fueron excluidas al constituir menos del 10% de la población estudiada. La información se obtuvo de los registros entre 1997 y 2001 y los casos se definieron como los pacientes que en ese periodo de tiempo presentaron por primera vez glaucoma. Se seleccionaron al azar 10 controles por cada caso entre los pacientes de la misma edad. En los registros se contabilizaron la prescripción de estatinas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pravastatina, simvastatina y lovastatina) y de otra medicación hipolipemiente (fibratos y ácido nicotínico). Asimismo, se registró la presencia de diabetes, hipertensión, enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y arteriopatía periférica que se consideraron factores de confusión para el ajuste en el cálculo del riesgo. El riesgo de aparición de glaucoma se expresó como *odd ratio* (OR, razón de momios en español) y su intervalo de confianza (IC). Los resultados principales se recogen en la Tabla 1.

Este trabajo mostró como el tratamiento con estatinas se asoció a un menor riesgo de aparición de glaucoma (OR 0,86; IC 95% 0,66-1,11) después del ajuste con las patologías anteriormente mencionadas. El riesgo se reduce y es significativo si el tratamiento con estatinas supera los 23 meses (OR 0,60; IC 95% 0,39-0,92). Aunque con un menor número de pacientes, los autores también calcularon el riesgo en pacientes que usaron otros hipolipemiantes (OR 0,59; IC 95% 0,37-0,97) o la combinación entre otros hipolipemiantes y estatinas (OR 0,52; IC 95% 0,24-1,04). A pesar de que la OR mostró un mayor efecto protector en pacientes que empleaban otros hipolipemiantes, este dato no fue estadísticamente significativo. Incluso presentando algunas limitaciones metodológicas, este trabajo constituye un punto de partida para los estudios posteriores.

En 2006 se publica un pequeño ensayo clínico en 12 voluntarios sanos, en los que se trató de valorar de la administración oral de simvastatina a corto plazo (7 días), sobre la circulación retiniana. Este pequeño ensayo mostró que simvastatina fue capaz de aumentar el flujo sanguíneo y la concentración de nitritos y nitratos en plasma (derivados del óxido nítrico), así como reducir la PIO⁽¹¹⁾. Este pequeño ensayo es el único estudio clínico no observacional que ha tratado de valorar los efectos oculares de las estatinas.

Ya en 2007, Castro et al. publicaron un estudio retrospectivo observacional en el que tratan de identificar los efectos protectores de estatinas sobre los daños en el nervio óptico presentes en pacientes en los que había sospecha de glaucoma⁽¹³⁾. Para ello, revisaron los historiales de 76 pacientes con sospecha de glaucoma, PIO y campo visual normal y que presentaran datos fiables de consumo de medicamentos. Para su estudio consideraron 4 grupos: usuarios de estatinas (n=12), de aspirina (n=13), estatinas y aspirina (n=12) y controles (n=39). Para ser incluidos en la clasificación, el periodo de utilización de estos medicamentos tenía que ser mayor de 23 meses.

En este estudio, se valoraron por láser confocal de barrido (Heidelberg Retina Tomograph, HRT) los parámetros estructurales del nervio óptico que sirvieron para valorar si los tratamientos tenían efectos neuroprotectores. De media a los pacientes se les hicieron $2,82 \pm 0,99$ pruebas HRT. Los datos (Tabla 1) muestran cómo el grupo de pacientes tratados con estatinas presentaron diferencias significativas respecto a los controles en los parámetros de volumen del anillo, variación de la altura del contorno, en el área de sección de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) y en el espesor de la CFNR. Los grupos de usuarios de aspirina y de aspirina y estatinas, mostraron también efectos protectores, aunque no llegaron a alcanzar una variación significativa⁽¹³⁾.

Este trabajo también recoge cuantos pacientes de cada grupo llegaron a desarrollar glaucoma, encontrando que fueron el 23,1% de los pacientes del grupo control, frente al 8,33% de los tratados con estatinas, el 23,1% de los tratados con aspirina y el 16,7% de los que recibieron ambos medicamentos. Esta menor proporción no resultó ser significativa, aunque esto podría deberse a que el tamaño de la muestra fue calculado con el número de ojos revisados necesarios para que, en los parámetros estructurales, se tuviera una potencia estadística del 80%⁽¹³⁾. Tampoco se puede descartar la pobre correlación entre los parámetros morfológicos evaluados por HRT y la progresión del glaucoma que han mostrado otros autores⁽²⁰⁾.

En 2010, un estudio prospectivo de cohorte evalúa si existe una asociación entre el consumo de simvastatina y la progresión de la reducción del campo visual en pacientes con glaucoma y PIO normal⁽²¹⁾. La cohorte constaba de 256 pacientes, de los que 31 (12,2%) estaba en tratamiento con simvastatina

(20 a 40 mg). A todos los pacientes se les hizo un seguimiento de 36 meses a intervalos de 4 meses para la evaluación de la progresión del campo visual.

En los resultados obtenidos (Tabla 1), se pudo observar que 8 de 121 (6,6%) de los sujetos con progresión del campo visual frente a 23 de 135 (17,0%) de los sujetos con campo visual estable estaban tomando simvastatina ($P=0,011$). Por lo tanto, el uso de estatinas se asoció con la estabilización del campo visual, ya que hubo un mayor número de pacientes que tomaban simvastatina que permanecieron estables y sin progresión. Además, el modelo de regresión logística con ajustes por antecedentes de accidente cerebrovascular, hemorragias de disco óptico y edad al inicio del estudio, mostró que el uso de simvastatina confirió un efecto protector contra la progresión de la reducción del campo visual, al obtener un riesgo relativo (RR) de 0,36 con un IC del 95% 0,14-0,91 ($P=0,030$). Un RR de 0,36 equivale a una reducción del riesgo de progresión de más del 60%.

No obstante, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P=0,213$) entre la PIO media en el grupo que recibió estatinas ($15,04 \pm 2,47$ mm Hg) en comparación con el grupo que no las recibió ($14,37 \pm 2,78$ mm Hg), ni entre la máxima medida de PIO en el grupo que tomaba estatinas ($17,61 \pm 2,93$ mm Hg) en comparación con el grupo que no ($17,71 \pm 3,71$ mm Hg) ($P=0,865$).

De nuevo el estudio presenta limitaciones, aunque los resultados son interesantes porque muestra un efecto de las estatinas sobre la progresión del glaucoma que no se relaciona con una reducción de la PIO y propone los efectos vasculares y neuroprotectores de las estatinas, como responsables de la acción. Asimismo, en el análisis univariante, no encontraron que otros medicamentos antihipertensivos (incluidos beta-bloqueantes), diuréticos o aspirina, afectaran al riesgo de progresión del deterioro del campo visual.

En 2012, otro estudio prospectivo de cohorte llevado a cabo por Marcus et al. corroboró el efecto protector de las estatinas frente a la aparición de GAA⁽²²⁾. En esta ocasión, el objetivo no fue evaluar solamente a las estatinas, sino a todos los agentes reductores de lípidos, aunque en los datos se diferenciaron a los inhibidores de HMG-CoA reductasa del resto de hipolipemiantes. Se realizó un seguimiento de 3939 pacientes mayores de 55 años, de los que el 2,7% desarrolló GAA. Durante el periodo de seguimiento 811 pacientes recibieron tratamiento con estatinas, frente a los 113 que requirieron otros hipolipemiantes. El periodo de seguimiento tuvo una duración media de 9,8 años y durante él se realizaron revisiones oftalmológicas que incluyeron campimetría y medidas de la PIO.

El riesgo de incidencia de GAA se expresó como cociente de riesgo (hazard ratio, HR) calculado gracias al modelo de regresión de Cox y con un ajuste por edad, sexo, valor basal de PIO, tratamiento con hipotensores oculares, historial familiar de glaucoma y presencia de miopía. Los resultados (Tabla 1) mostraron una reducción significativa del riesgo de GAA en los pacientes tratados con estatinas (HR 0,59; IC 95% 0,31-0,96; $P=0,034$). Por el contrario, en el grupo tratado con otros hipolipemiantes, el riesgo fue mayor, aunque sin alcanzar la significación estadística (HR 2,07; IC 95% 0,81-5,33; $P=0,13$). Cuando solo se consideraban tratamientos de estatinas con una duración mayor de 2 años, el valor de HR se reduce a 0,46 (IC 95% 0,23-0,94; $P=0,033$)⁽²¹⁾.

En concordancia con los estudios previos, Marcus et al. no encontraron que las estatinas fueran capaces de reducir la PIO, por tanto, se posicionaron a favor de que un potencial efecto neuroprotector de las estatinas, estuviera implicado en su acción preventiva⁽²²⁾.

El efecto protector de las estatinas es corroborado por otro estudio de cohorte, aunque en esta ocasión es retrospectivo longitudinal⁽²⁾. Este análisis incluyó a 524.109 individuos mayores de 60 años, con hiperlipidemia diagnosticada y un historial de al menos una visita previa al oftalmólogo o al optometrista. Para el cálculo del HR, se empleó la regresión de Cox multivariante ajustando por factores de confusión demográficos (edad, sexo, raza) y de comorbilidades oculares (cataratas, degeneración macular...) o generales (hipertensión, diabetes), así como por el índice de comorbilidad de Charlson. En esta ocasión, se midieron cuatro variables dependientes: la aparición de glaucoma de ángulo abierto de nuevo diagnóstico, la progresión desde sospecha a diagnóstico confirmado de GAA, la necesidad de tratamiento farmacológico y la de tratamiento quirúrgico.

Los resultados se expresaron como la estimación del HR por cada mes o cada año de tratamiento con estatinas sobre las variables descritas. Asimismo, se calculó el porcentaje de reducción del riesgo que supondrían un mes, un año o dos años de tratamiento. Los resultados se recogen en la Tabla 1. Destaca que mientras la necesidad de tratamiento quirúrgico no se ve reducida, cada mes de tratamiento con estatinas reduce el riesgo de nuevo diagnóstico en 0,3%, el riesgo de evolución de sospecha a diagnóstico confirmado en 0,4% y la necesidad de tratamiento hipotensor ocular en 0,4%. El riesgo de aparición de GAA después de 1 año de estatinas, se redujo en 5%, mientras que después de 2 años, llegó al 9% de reducción. Estos datos muestran un efecto protector a largo plazo y de nuevo concuerdan con lo mostrado en los estudios anteriores^(19,22). Al contrario que McGwin et al.⁽¹⁹⁾, pero en concordancia con Marcus et al.⁽²²⁾, el resto de hipolipemiantes no confiere un efecto protector. Este trabajo también muestra cómo los pacientes con un glaucoma avanzado (los que podrían necesitar una intervención quirúrgica), no obtienen beneficio del tratamiento con estatinas.

Este mismo grupo de investigación publicó en 2017 un segundo estudio de cohorte en el que se trató de evaluar si la dosis o el tipo de estatina empleado, afectaba al efecto preventivo de la aparición de GAA⁽²³⁾. La cohorte estaba formada por más de 25.000 pacientes, todos ellos mayores de 60 años, con dislipemia, sin diagnóstico preexistente de GAA, y que tuvieron un seguimiento por parte de un oftalmólogo u optometrista durante un periodo de dos años. Este estudio confirmó que el riesgo de aparición de GAA era un 21% menor en los usuarios de estatinas. Además, puso de manifiesto la no existencia de diferencia entre atorvastatina y el resto de las estatinas prescritas (lovastatina, simvastatina, cerivastatina, fluvastatina, rosuvastatina y pravastatina). Tampoco encontró diferencias entre la dosis diaria de 40 mg y el resto de las dosis (10, 20 y 80 mg). Los valores de HR se recogen en la Tabla 1. Debido a que el riesgo de efectos adversos aumenta con el incremento de la dosis diaria de estatinas, exponer a los participantes a una dosis alta de 80 mg parecería innecesario, siendo una dosis de 40 mg o menos más apropiada. Además, en comparación con la atorvastatina, ningún otro tipo de estatina fue más protector contra el GAA. Por esta razón, el estudio concluye que atorvastatina 40 mg sería la propuesta a seleccionar para un ensayo clínico dirigido a constatar y medir el efecto protector frente al GAA⁽²³⁾.

Al igual que Leung et al. mostraron en 2010 que las estatinas prevenían la progresión del GAA en una cohorte de pacientes de Hong-Kong⁽²¹⁾, en 2018, es publicado otro estudio con un objetivo similar, aunque en esta ocasión en una cohorte de veteranos en Estados Unidos que habían sido diagnosticados de GAA⁽²⁴⁾. La cohorte estuvo constituida por 847 pacientes, mayoritariamente hombres caucásicos y afroamericanos en los que se comprobó que la progresión del GAA sobre el campo visual aparecía en el 32,9% de los pacientes usuarios de estatinas frente al 54,4% de los pacientes no usuarios ($P < 0,001$). Con el objetivo de descartar la influencia de otros factores sobre la progresión del glaucoma, este trabajo propuso un modelo predictivo que se empleó para clasificar a los pacientes en función de su propensión a la progresión del glaucoma. Con estos datos, se seleccionaron grupos control y casos (usuarios de estatinas) pareados y se comprobó que la proporción de pacientes en los que se manifiesta la progresión del deterioro del campo visual era de nuevo menor en los usuarios de estatinas (34,9% versus 56,6%; $P < 0,001$).

Ya en 2020, la pregunta de qué tipo de estatina podría tener algún efecto sobre la aparición de GAA vuelve a aparecer en la literatura. En esta ocasión, se valora en una cohorte de pacientes provenientes de Japón y que habían iniciado tratamiento con estatinas en los 6 meses anteriores⁽²⁵⁾. La cohorte se dividió entre usuarios de estatinas de alta potencia (atorvastatina y rosuvastatina) y de baja potencia (pravastatina, fluvastatina, pitavastatina y simvastatina). La HR estimada para la aparición de glaucoma no mostró diferencias entre los grupos (HR=1,08; IC 95% 0,93-1,24). Sin embargo, este trabajo no analiza la estimación frente a los no usuarios, por lo que solo se podría concluir que, en cortos periodos de empleo, todas las estatinas podrían tener un efecto similar sobre la aparición de glaucoma, tal y como ya proponía un trabajo previo⁽²³⁾.

Tabla 1. Resumen de los resultados de los estudios que muestran efecto protector de las estatinas frente al glaucoma.

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|---|--|
| McGwin et al., 2004 ⁽¹⁹⁾ | Casos y controles anidados | Varones >50 años. Casos (n=667) diagnostico glaucoma en historia clínica. Controles (n=6667) | Riesgo de aparición de glaucoma OR (IC 95%) | OR EST: 0,86 (0,66-1,11) OR HPL: 0,60 (0,30-1,18) OR HPL+EST: 0,52 (0,26-1,04) OR EST >23 meses: 0,60 (0,39-0,92) | Diabetes, dislipemia, HTA, enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica. |
| Nagaoka et al. 2006 ⁽¹²⁾ | Ensayo clínico controlado aleatorio | Voluntarios sanos (n=12) | PIO (mmHg) a los 90 min y a los 7 días de SV | PIO basal: 14,3 ± 0,4 PIO SV 90 min: 12,6 ± 0,5 (P<0,05) PIO SV 7 días: 12,4 ± 0,6 (P<0.01) | |
| Castro et al. 2007 ⁽¹³⁾ | Cohorte retrospectivo | Pacientes con sospecha de glaucoma, PIO y campo visual normal (n=76) | Variación parámetros estructurales nervio óptico (HRT) | Parámetros en grupo EST Volumen anillo: 26,7% (P=0,0156) Variación altura contorno: 14,7% (P=0.0118) Área CFNR: 24,3% (P=0.0051) CFNR: 26,6% (P=0,0114) | Edad, sexo, raza, PIO, grosor corneal, error refractivo, HTA, diabetes, migraña, cáncer, dislipemia hipotiroidismo, enfermedad autoinmune, vasculitis, enfermedad coronaria, cerebral o arteriopatía periférica. |
| | | | % pacientes que desarrollan glaucoma | control: 23,1% EST: 8,33% aspirina: 23,1% EST+aspirina: 16,7% | |
| Leung et al. 2010 ⁽²¹⁾ | Cohorte prospectivo | Pacientes con glaucoma y PIO normal (n=256) | RR (IC 95%) de progresión de la reducción del campo visual | RR HD: 3,26 (1,21-8,76) P=0,019 RR SV: 0,36 (0,14-0,91) P=0,030 RR ACV: 2,28 (1,03-5,06) P=0,043 RR Edad: 1,38 (1,08-1,76) P=0,009 | Antecedentes de ACV, hemorragias de disco óptico y edad. |
| Marcus et al. 2012 ⁽²²⁾ | Cohorte prospectivo | Pacientes mayores de 55 años (n=3939) | HR (IC 95%) de aparición de glaucoma | EST HR: 0,54 (0,31-0,96) P=0,0034 EST>2 años HR: 0,46 (0,23-0,94) P=0,033 HPL HR: 2,07 (0,81-5,33) P=0,13 | Edad, sexo, PIO basal, tratamiento con hipotensores oculares, historial familiar de glaucoma, miopía |

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|--|--|--|
| Stein et al., 2012 ⁽²⁾ | Cohorte retrospectivo longitudinal | Pacientes mayores de 60 años, con hiperlipidemia y visita oftalmológica previa (n=524109) | HR (IC 95%) por mes o año o 2 años de GAA nuevo, confirmación de sospecha de GAA, necesidad tratamiento farmacológico o quirúrgico | <p>HR por mes de EST HR nuevo GAA: 0,997 (0,994-0,999) P=0,0056 HR diagnostico GAA: 0,996 (0,993-0,999) P=0,0062 HR tratamiento HO: 0,996 (0,993-0,998) P=0,0002 HR cirugía: 1,002 (0,994-1,010) P=0,6811</p> <p>HR por año de EST HR nuevo GAA: 0,960 (0,933-0,999) P=0,0056 HR diagnostico GAA: 0,952 (0,920-0,986) P=0,0062 HR tratamiento HO: 0,950 (0,924-0,976) P=0,0002 HR cirugía: 1,002 (0,925-1,127) P=0,6811</p> <p>HR por 2 años de EST HR nuevo GAA: 0,922 (0,870-0,976) P=0,0056 HR diagnostico GAA: 0,907 (0,846-0,973) P=0,0062 HR tratamiento HO: 0,902 (0,854-0,953) P=0,0002 HR cirugía: 1,042 (0,856-1,269) P=0,6811</p> | Edad, sexo, raza, comorbilidades oculares, HTA, diabetes, índice de Charlson |

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|--------------------------------------|-----------------------|--|--|---|---|
| Talwar et al. 2017 ⁽²³⁾ | Cohorte retrospectivo | Pacientes >60 años, con dislipemia y sin diagnóstico GAA y con seguimiento oftalmológico en 2 años (n=25420) | HR (IC 95%) de aparición de GAA. Comparación con ATV | EST HR: 0,79 (0,66-0,96) P=0,02 EST 80mg HR: 1,03 (0,59-1,80) P=0,91 Comparación vs ATV LV HR: 1,09 (0,71-1,68) P=0,69 CV HR: 0,61 (0,09-4,41) P=0,63 RSV HR: 0,83 (0,48-1,41) P=0,51 FLV HR: 0,89 (0,39-2,02) P=0,78 PV HR: 1,29 (0,93-1,79) P=0,13 SV HR: 1,03 (0,83-1,29) P=0,78 | Edad, sexo, raza, situación socioeconómica, LDL basal, HTA, obesidad, apnea sueño, diabetes, migraña, patología ocular, uso de HPL, índice de Charlson |
| Whigham et al., 2018 ⁽²⁴⁾ | Cohorte retrospectivo | Pacientes con GAA reflejado en historial clínico y visitas a consulta oftalmológica (n=847) | % pacientes en los que progresa el deterioro del campo visual | % progresa control: 56,6 % progresa EST: 34,9%; P<0,001 | Sexo, edad en la visita inicial, raza, enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedad cerebrovascular, insuficiencia renal, severidad basal del glaucoma |
| Ooba et al., 2020 ⁽²⁵⁾ | Cohorte retrospectivo | Pacientes 40-75 años estatinas durante 6 meses mínimo y sin diagnóstico de glaucoma. Excluye diabéticos | HR (IC 95%) de aparición de GAA. Comparación entre estatinas de alta y baja potencia | HR: 1,08 (0,93-1,24); P=0,31 | Edad, sexo, medicación concomitante, comorbilidades, índice Charlson |

ACV: accidente cerebrovascular; ATV: atorvastatina; CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina; CV: cerivastatina; EST: estatinas; FLV: fluvastatina; GAA: glaucoma de ángulo abierto; LV: lovastatina; HD: hemorragia disco; HO: hipotensor ocular; HPL: otros hipolipemiantes; HR: hazard ratio; HRT: Heidelberg Retina Tomografía; HTA: hipertensión arterial; IC: intervalo de confianza; OR: Odd-ratio; PIO: presión intraocular; PV: pravastatina; RR: riesgo relativo; RSV: rosuvastatina; SV: simvastatina.

Estudios que no encuentran relación entre las estatinas y el glaucoma

En 2009, Iskedjian et al. exploraron la posibilidad de que varios medicamentos sistémicos entre los que se encuentran las estatinas, pudieran ralentizar la progresión del glaucoma⁽¹⁴⁾. Para ello, se revisaron los datos de prescripción de medicamentos de una aseguradora de Canadá durante más de 8 años y se cuantificaron los pacientes que tuvieran prescritos colirios con análogos de prostaglandinas considerados de elección en el tratamiento del glaucoma (8548 pacientes). Se trata, por tanto, de un estudio observacional y retrospectivo.

El empeoramiento de la patología ocular se definió como la necesidad de añadir otro hipotensor ocular adicional al análogo de prostaglandinas en el primer año de haber sido prescrito. Asimismo, se cuantificaron los pacientes a los que se hubieran prescrito antihipertensivos, antidiabéticos, diuréticos y estatinas y se exploró la asociación entre la doble terapia hipotensora ocular y la prescripción de medicación sistémica.

Este trabajo no encuentra que la proporción de pacientes que requieren terapia adicional al latanoprost, bimatoprost o travoprost, fuera menor en los que usaban estatinas. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la proporción de pacientes que iniciaron la terapia adyuvante en aquellos que usaban estatinas (29,2%; $P=0,076$) en comparación con aquellos que no tomaban medicamentos sistémicos (32,4%, Tabla 2). Sin embargo, se puede observar que sí hubo diferencia estadísticamente significativa en la proporción de pacientes que iniciaron la terapia adyuvante de glaucoma entre aquellos que tomaban estatinas junto con antihipertensivos (25,2%; $P<0,001$) y aquellos que no tomaban medicamentos sistémicos (32,4%). Ocurre lo mismo con aquellos pacientes que combinaban estatinas con antihipertensivos y medicamentos antihipertensivos (21,8%; $P<0,001$) y aquellos que usaban diuréticos y al menos 1 de los siguientes medicamentos: estatinas, antihipertensivos o antihipertensivos (24,5%; $P<0,001$). Así pues, en estos casos fueron menos los pacientes que comenzaron una terapia complementaria para el tratamiento del glaucoma.

Tampoco los que estaban en tratamiento con antihipertensivos presentaron diferencias en la necesidad de otro hipotensor ocular (36,4%; $P=0,266$). Por el contrario, encontraron que los antagonistas del calcio, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y la combinación de antihipertensivos sí se asociaban a una menor proporción de pacientes que necesitaron más de un fármaco oftálmico hipotensor ocular⁽¹⁴⁾.

Otro estudio retrospectivo de casos y controles llevado a cabo en Reino Unido en 2010 tampoco encontró que las estatinas protegieran frente al glaucoma. En esta ocasión, el objetivo fue conocer si los beta-bloqueantes y las estatinas lograban asociarse a una menor prevalencia de glaucoma. Sin distinción del tipo de glaucoma, los casos fueron 8778 pacientes en cuyos historiales recogieran el diagnóstico de glaucoma. Como controles se tomaron los datos de 8778 pacientes con similares características demográficas y sin diagnóstico de glaucoma⁽¹⁵⁾.

Se calcularon las OR de tratamiento con estatinas y betabloqueantes (beta1 selectivos y no selectivos) en los 5 años anteriores al diagnóstico de glaucoma con un ajuste por comorbilidades, número de medicamentos usados y nivel socioeconómico. Los datos se muestran en la Tabla 2 y podemos comprobar cómo la OR para los pacientes usuarios de estatinas fue de 0,96 (IC 95% 0,88-1,06). Al contrario de lo publicado previamente⁽¹⁴⁾, tampoco los antagonistas del calcio se asociaron a una protección frente a glaucoma. Los que sí lograron mostrar un efecto protector fueron los beta-bloqueantes beta1 selectivos con una OR de 0,85 (IC 95% 0,78-0,92).

Parte de este efecto protector de los beta-bloqueantes, pero no de otros fármacos, podría ser atribuido a su capacidad para reducir la PIO. En 2014, y en una cohorte de pacientes británicos de 40 a 79 años sin historial de glaucoma, se valoró la posible asociación entre su medicación sistémica (antagonistas del receptor de angiotensina II -ARAII-, IECAs, antagonistas de calcio, alfa-bloqueantes, beta-bloqueantes, nitratos, diuréticos, aspirina, estatinas, insulina, sulfonilureas y AINE) y el cambio de la PIO⁽¹⁶⁾. El estudio mostró cómo beta-bloqueantes y nitratos redujeron significativamente la PIO (-0,92 mmHg y -0,63 mmHg, respectivamente). Aunque en un primer análisis, tanto estatinas como aspirina se asociaban a menores valores de PIO, el ajuste con los beta-bloqueantes como factor de corrección, descartó dicha asociación.

Ya en 2019, y con el objetivo de confirmar la asociación de dislipemia y GAA en la población coreana, se publica un estudio en el que se evalúan parámetros morfológicos del nervio óptico y perfil lipídico en 16934 pacientes mayores de 40 años⁽²⁶⁾. En este estudio no se distinguen las estatinas de otros hipolipemiantes, como tampoco se ven reflejados como factores de confusión el empleo de otros medicamentos sistémicos que como hemos visto, podrían afectar a la PIO^(14,16). Aunque en un primer análisis, los pacientes en tratamiento mostraron mayor riesgo de GAA (OR= 1,51; IC95% 1,15-1,98; $P<0,03$), tras realizar la corrección con los factores de confusión que mostraron predisponer al glaucoma (edad, PIO elevada, miopía y tasa de filtrado glomerular reducida), el riesgo de GAA fue similar en ambos grupos (OR=1,08; IC95% 0,75-1,56; $P=0,83$).

Tampoco el estudio longitudinal llevado a cabo en 2019 en Holanda con pacientes diagnosticados de GAA o con sospecha del mismo, encontró que el tratamiento con estatinas cambiara alguno de los parámetros evaluados. En esta ocasión, el objetivo fue comprobar si existía asociación entre el tratamien-

to con estatinas, diuréticos, beta-bloqueantes, antagonistas del calcio, IECAs y ARAII y la aparición de GAA o el paso de sospecha a diagnóstico confirmado. En esta ocasión fueron los IECAs y ARAII los que mostraron una asociación protectora frente a la progresión del GAA⁽¹⁸⁾. Es destacable que, sin realizar la corrección que tuviera en cuenta los tratamientos antihipertensivos, las estatinas mostraron un efecto protector frente al paso de sospecha a confirmación de GAA (OR=0,26; 95%IC 0,1-0,65; P=0,014). Por tanto, se pone de manifiesto la necesidad de que estos estudios observacionales registren y valoren la influencia no solo de las estatinas, sino de al menos los medicamentos antihipertensivos.

Tabla 2. Resumen de los resultados de los estudios que no encuentran asociación entre el empleo de estatinas y el glaucoma.

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|--|-----------------------|---|--|---|---|
| Iskedjian et al., 2009 ⁽¹⁴⁾ | Cohorte retrospectivo | Pacientes que tuvieran prescrito tratamiento con colirios análogos de prostaglandinas | % pacientes que requieren terapia adicional. Asociación con medicación sistémica (compara vs pacientes sin medicación sistémica) | % no medicación sistémica: 32,4 % EST: 29,2 (P=0,076) % Anti-HTA: 22,5 (P<0,001) % BB: 23,6 (P=0,114) % ACA: 21,4 (P=0,011) % IECA: 22,6 (P=0,001) % anti diabético: 36,4 (P=0,266) % Anti-HTA + EST: 25,2 (P<0,001) % Antidiab+EST: 32,0 (P=0,745) %Antidiab+Anti-HTA+EST: 21,8 (P<0,001) | Edad, sexo |
| Owen et al., 2010 ⁽¹⁵⁾ | Casos y controles | Casos: pacientes con cualquier tipo de glaucoma (n=8778) Controles: similares características demográficas sin glaucoma (n=8778) | OR (IC 95%) de tratamiento con EST y BB en 5 años anteriores al glaucoma | OR BB: 0,90 (0,83-0,97) OR BB select: 0,85 (0,78-0,92) OR BB no select: 1,09 (0,95-1,25) OR IECA: 1,01 (0,94-1,09) OR ACA: 1,03 (0,95-1,12) OR DIUR: 1,10 (1,02-1,18) OR EST: 0,96 (0,88-1,06) OR otros anti-HTA: 1,05 (0,92-1,18) | Edad, sexo, comorbilidades, número de medicamentos, y nivel socioeconómico. |

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|---------------------------------------|---------|--|--|--|--|
| Khawaja et al., 2014 ⁽¹⁶⁾ | Cohorte | Pacientes de 40 a 79 años sin historial de glaucoma (n=7093) | Cambio en la PIO media (IC 95%) | IECA: -0,07 (-0,29-0,15) P=0,55 ARAI: 0,07 (-0,26-0,40) P=0,68 AB: -0,23 (-0,56-0,11) P=0,18 BB: -1,03 (-1,28- -0,78) P<0,001 ACA: -0,15 (-0,40-0,20) P=0,82 Nitratos: -1,08 (1,54- -0,62) P<0,001 EST: -0,31 (-0,51- -0,12) P=0,002 Insulina: 0,07 (-0,77- 0,91) P=0,87 Aspirina: -0,46 (-0,67- -0,25) P<0,001 AINEs: -0,02 (-0,32- 0,27) P=0,88 | Edad, sexo e IMC. HbA1c en pacientes con antidiabéticos |
| Shon y Sung, 2019 ⁽²⁶⁾ | Cohorte | Pacientes > 40 años, seguimiento oftalmológico (exclusión por patología ocular diferente de GAA). Grupos con y sin tratamiento para dislipemia (n=16934) | OR (IC 95%) de GAA y alteraciones morfológicas del nervio óptico | OR GAA: 1,08 (0,75- 1,56) P=0,838 OR HDO: 0,64 (0,15- 2,73) P=0,648 OR CAD elevado: 1,02 (0,81-1,28) P=0,763 OR espesor CFNR: 0,97 (0,67-1,42) P=0,857 | Edad, PIO elevada, miopía, tasa de filtración glomerular reducida |
| Pappelis et al., 2019 ⁽¹⁸⁾ | Cohorte | Pacientes con diagnóstico o sospecha de GAA en su historial (n=362) | OR (IC 95%). Relación entre medicación sistémica y conversión de sospecha a diagnóstico de GAA | Análisis univariante OR EST: 0,26 (0,1-0,65) P=0,002 OR DIUR: 0,20 (0,07-0,59) P=0,001 OR ARAI: 0,11 (0,01-0,87) P=0,008 OR IECA: 0,24 (0,07- 0,78) P=0,009 OR ACA: 0,50 (0,17- 1,44) P=0,19 OR BB: 0,53 (0,22-1,28) P=0,15 OR IBP: 0,62 (0,26- 1,43) P=0,26 Análisis multivariante: OR ARAI: 0,12 (0,01- 0,98) P=0,014 OR IECA: 0,23 (0,07- 0,79) P=0,012 | Ninguno Sexo, PIO antes del tratamiento, tratamiento anti-HTA |

AB: alfa-bloqueante; ACA: antagonista de calcio; AINEs: antiinflamatorios no esteroideos; ARAI: antagonista receptor de angiotensina II; BB: beta-bloqueante; CAD: cociente área-disco; CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina; DIUR: diuréticos; EST: estatinas; GAA: glaucoma de ángulo abierto; HDO: hemorragia del disco óptico; HTA: hipertensión arterial; IBP: inhibidor de la bomba de protones; IC: intervalo de confianza; IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; IMC: índice de masa corporal; OR: odd-ratio; PIO: presión intraocular.

Estudios que muestran un mayor riesgo de glaucoma en pacientes tratados con estatinas

Como se ha expuesto, no todos los trabajos que investigaban el posible efecto de las estatinas sobre el desarrollo del glaucoma mostraron el mismo resultado. De hecho, en 2015 se publicó un estudio observacional de casos y controles llevado a cabo en Taiwan que mostró un mayor riesgo glaucoma en los pacientes tratados con estatinas a dosis altas⁽²⁷⁾.

Este estudio incluyó 1276 casos, definidos como pacientes con GAA e hiperlipidemia y 12760 controles que no presentaron glaucoma, pero sí hiperlipidemia. Los controles presentaban características similares que los casos en cuanto a edad, sexo, historial de diabetes y años de diagnóstico de hiperlipidemia y fueron seleccionados en razón 1:10. El trabajo presenta como novedad la clasificación de los pacientes en tres grupos en función de las dosis de estatinas empleadas. Para esta clasificación se calculó la dosis diaria definida acumulativa (DDDd) por año, dando lugar a tres grupos: dosis bajas (hasta 30 DDDd), intermedias (30 a 119 DDDd) y altas (a partir de 120 DDDd). Los principales resultados se muestran en la Tabla 3.

El cálculo de las OR se ajustó teniendo en cuenta como factores de confusión la edad, el sexo, las comorbilidades (hipertensión arterial y depresión), el índice de Charlson de comorbilidad, la frecuencia de visitas al oftalmólogo y el uso de hipolipemiantes no estatinas. En general, la incidencia del GAA no resultó afectada por el uso de estatinas, mostrando una OR de 1,02 (95% IC, 0,90-1,15). Sin embargo, al seleccionar el grupo tratado con dosis altas de estatinas, la OR fue de 1,24 (95%IC, 1,03-1,24), mostrando un riesgo 1,24 veces superior de aparición de glaucoma en los pacientes que recibieron estas dosis altas de los inhibidores de HMG-CoA reductasa. Por tanto, las dosis altas aumentaban la incidencia de glaucoma de manera significativa (P=0,0458).

Otro de los resultados negativos fue reportado por Ho et al. en 2017⁽¹⁷⁾ que, aunque no estudiaron la asociación entre consumo de estatinas y riesgo de glaucoma, mostraron que los pacientes tratados con estos fármacos presentaban valores superiores de PIO, con un aumento estimado en 0,21 mmHg (95% IC, 0,02-0,4; P=0,03). En este estudio llevado a cabo en Singapur, se incluyeron pacientes sin patología ocular previa y se cuestionó si diferentes medicamentos sistémicos podrían afectar a la PIO, con el resultado de que tan solo los beta-bloqueantes fueron capaces de reducir la PIO. Este estudio emplea una corrección por el objetivo de la medicación sistémica con la finalidad de identificar efectos que fueran independientes de las acciones principales. Así, el efecto de las estatinas fue corregido tomando como factor de confusión los niveles de lípidos y el efecto de los beta-bloqueantes tomando el valor de presión arterial.

Tabla 3. Resumen de los resultados de los estudios que encuentran un mayor riesgo de glaucoma en pacientes tratados con estatinas.

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|-----------------------------------|-------------------|---|--|---|---|
| Chen et al., 2015 ⁽²⁷⁾ | Casos y controles | Casos (pacientes con GAA e hiperlipidemia n=1276). Controles hiperlipidemia (n=12760) | OR (IC 95%) de GAA en grupos con dosis bajas, intermedias o altas de EST | OR dosis bajas: 0,87 (0,73-1,03) OR dosis intermedias: 1,03 (0,88-1,27) OR dosis elevadas: 1,24 (1,03-1,49) P=0,0048 | Edad, sexo, HTA, depresión, índice de Charlson, número de visitas a oftalmólogo, años de dislipemia, uso de HPL |

| Estudio | Tipo | Participantes | Parámetros evaluados | Resultados | Factores de confusión |
|--------------------------------|---------|--|----------------------------|---|---|
| Ho et al. 2017 ⁽¹⁷⁾ | Cohorte | Pacientes 40-80 años. Examen oftalmológico y exclusión de pacientes con patología ocular que afecte a PIO (n=8063) | Cambios en la PIO (IC 95%) | IECA: 0,33 (0,08-0,57) P=0,08 ARAI: 0,40 (0,05-0,75) P=0,02 BB: -0,45 (-0,65- -0,25) P<0,001 BIG: 0,16 (-0,11-0,43) P=0,25 SU: 0,34 (0,05-0,63) P=0,02 EST: 0,21 (0,02-0,4) P=0,03 | Edad, sexo, IMC, raza y valor objetivo de la medicación sistémica (presión arterial en HTA y perfil lipídico en dislipemia) |

ARAI: antagonista del receptor de angiotensina II; BB: beta-bloqueantes; BIG: biguanidas; EST: estatinas; HPL: otros hipolipemiantes; IC: intervalo de confianza; IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; IMC: índice de masa corporal; OR: odd-ratio; PIO: presión intraocular; SU: sulfonilurea.

Meta-análisis

En 2017, McCann et al. publican un meta-análisis de todos los resultados publicados hasta el momento que trataran de relacionar el tratamiento con estatinas y el glaucoma⁽¹²⁾. Una vez filtrados por la evaluación de la calidad de los estudios, los autores incluyeron tan solo cinco de los trabajos hasta entonces publicados^(2,15,19,22,28).

Para el análisis conjunto se calculó la OR para la aparición de glaucoma en pacientes tratados con estatinas menos de 2 años, más de 2 años o por un periodo indefinido de tiempo. Tan solo la OR en el tratamiento con inhibidores de la HMG-CoA reductasa a corto plazo, mostró un resultado significativo (Tabla 4). Llama la atención, que este resultado se opone a lo que en general muestran los estudios individuales. De hecho, McCann et al. muestran una OR de 0,70 (IC 95%, 0,46-1,06) en el grupo de estatinas durante más de 2 años, aunque un valor de P=0,09 no permite generalizar la conclusión⁽¹²⁾.

El meta-análisis señala algunas limitaciones importantes. Por ejemplo, las diferencias en la selección de los pacientes con glaucoma, que en algunos solo requiere que estuviera registrado en su historia^(2,19,22,28) mientras que en uno de ellos se realiza diagnóstico clínico⁽¹⁵⁾. Por otro lado, no todos corrigen los mismos factores de confusión, proponiendo McCann et al. que el empleo de beta-bloqueantes y de otros hipolipemiantes, deberían ser considerados siempre⁽¹²⁾.

Tabla 4. Asociación entre uso de estatinas e incidencia de glaucoma. Cálculo del meta-análisis de McCann et al.⁽¹²⁾

| | OR (IC 95%) | P |
|--|------------------|------|
| Uso estatinas ≤ 2 años | 0,96 (0,94-0,99) | 0,05 |
| Uso estatinas > 2 años | 0,70 (0,46-1,06) | 0,09 |
| Uso estatinas sin estratificación por duración del tratamiento | 0,94 (0,83-1,06) | 0,33 |

Discusión

Una vez revisados los datos clínicos, no resulta concluyente afirmar que las estatinas puedan prevenir la aparición de glaucoma o proteger frente a su avance. Aunque la mayoría de los estudios publicados muestran algún efecto protector^(2,12-13,19,21-25), otros no llegan a mostrar algún efecto^(14-16,26-27) e incluso algunos estudios muestran un mayor riesgo en dosis altas de estatinas⁽²⁸⁾ y una repercusión negativa sobre la PIO de los pacientes que emplean estos medicamentos⁽¹⁷⁾.

Esta discrepancia entre los resultados encontrados podría explicarse si tenemos en cuenta algunas de las limitaciones de los estudios. Todos ellos son estudios observacionales, de cohorte o de casos y con-

troles, y han sido llevados a cabo en un único país. Por tanto, las características de la población pueden ser muy diferentes, por ejemplo, en cuanto a la presencia de individuos de diferentes grupos raciales. Mientras que los estudios realizados en Estados Unidos incluyen a población caucásica, afroamericana y latina, los originarios de países asiáticos, no representan a los mismos grupos. Por ejemplo, en el estudio de Ho et al. realizado en Singapur, los grupos incluidos fueron chinos, indios y malayos⁽¹⁷⁾. Incluso, en dos de los trabajos publicados, la cohorte provenía de un grupo de veteranos estadounidenses con nula⁽¹⁹⁾ o mínima⁽²⁴⁾ representación de mujeres.

Pero no solamente las características de la población dependen del lugar en el que se lleve a cabo el estudio. Al tratarse de investigaciones observacionales, el empleo de estatinas y de cualquier otra medicación sistémica objeto de análisis, viene condicionado por las guías de práctica clínica vigentes en cada momento y para cada país. Por lo tanto, el nivel de LDL a partir del que se prescriba una estatina y la dosis de estatina seleccionada, puede también diferir entre los estudios, ya que vendrían condicionados por la práctica clínica.

Observamos que en algunos de los estudios⁽¹³⁻¹⁸⁾, no solamente se valora el efecto de las estatinas, sino que se analizan también otros medicamentos. Entre ellos queremos destacar aspirina, beta-bloqueantes, IECAs y ARaII, ya que al igual que para las estatinas, los resultados no son homogéneos. En general, aquellos estudios que incluyen varias medicaciones sistémicas, no encuentran un efecto protector o al menos no significativo de las estatinas⁽¹⁴⁻¹⁸⁾. De hecho, sería recomendable que en futuros estudios observacionales en los que se pretendiera evaluar el efecto de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa sobre la progresión o incidencia del GAA, se midiera también el consumo de otros medicamentos sistémicos y estos fueran considerados factores de confusión para el análisis estadístico de los datos. De hecho, y como se recoge en las Tablas 1, 2 y 3, no todos los estudios incluyen los mismos factores de confusión en el análisis.

Sin embargo, a pesar de esta disparidad, sí que existen algunos datos experimentales tanto en pacientes como en modelos animales, que pueden ayudar a explicar un efecto protector de las estatinas sobre la progresión y desarrollo del GAA. Entre ellos, debemos destacar el potencial efecto neuroprotector de estos fármacos, que bien podría extenderse al nervio óptico. Las estatinas han mostrado su capacidad para prevenir la muerte neuronal por daño isquémico, habiéndose propuesto como mecanismos de esta neuroprotección la reducción de la toxicidad del glutamato⁽²⁸⁻²⁹⁾ y su capacidad antiinflamatoria de estos fármacos⁽³⁰⁾. Este efecto neuroprotector ha sido también demostrado en un modelo de isquemia-reperfusión de la retina en ratas⁽³⁰⁾. El ensayo de Castro et al. en el que se confirma una mejora en los parámetros estructurales del nervio óptico de los pacientes en tratamiento con estatinas vendría a corroborar la importancia de la neuroprotección en los efectos de las estatinas⁽¹³⁾.

Asimismo, la viabilidad de la cabeza del nervio óptico depende en gran medida de la perfusión ocular especialmente de la retina. En este sentido, las estatinas también son capaces de aumentar el calibre de arterias retinianas⁽¹¹⁾ y bien podría ampliarse este efecto a la vasculatura periférica del nervio óptico. Este efector promotor de la circulación retiniana, se propone como dependiente de un aumento en la producción de óxido nítrico y ha sido confirmado en diferentes modelos animales y estudios clínicos, y corroborado en estos mismos pacientes⁽¹¹⁾.

Pero además de la neuroprotección, no se puede descartar que las estatinas puedan también mejorar el flujo trabecular del humor acuoso, contribuyendo a una reducción de la PIO. La inhibición de la isoprenilación de Rho GTPasa y de la actividad Rho-quinasa, son consecuencia de la inhibición de la HMG-CoA reductasa y forman parte de los efectos pleiotrópicos de las estatinas. Esta inhibición de Rho-quinasa, es capaz de aumentar de manera significativa la salida del humor acuoso a través de la malla trabecular^(6,31). Además, existe cierta evidencia de que el aumento del óxido nítrico disminuye la PIO⁽³²⁾. La reducción de la PIO ha sido de nuevo confirmada en pacientes⁽¹¹⁾, aunque no queda igualmente reflejada en los estudios observacionales que hemos revisado^(21,22,16).

En resumen, y aunque el resultado no es el mismo en todos los estudios, si existe una base farmacológica para explicar un efecto protector de las estatinas frente a la aparición o al agravamiento del GAA. En este sentido, al profundizar en los datos revisados resultan interesantes algunos aspectos. El primero de ellos es que este efecto parece ser común a todos los fármacos de la clase⁽²³⁾ y que no parece

requerir dosis altas, que incluso podrían ser perjudiciales⁽²⁷⁾. El segundo comentario es el relacionado con la duración del tratamiento, donde de nuevo, nos encontramos con algunas limitaciones. Si bien varios trabajos muestran una mayor protección con tratamientos superiores a 2 años^(2,19), el meta-análisis de los mismos, no llega a reflejar esta situación⁽¹²⁾.

Como conclusión, la evidencia publicada no es suficiente como para recomendar el tratamiento con estatinas con el objetivo de prevenir el avance o la aparición del glaucoma. Sin embargo, no se puede descartar que estos fármacos puedan contribuir a la protección de aquellos pacientes que los usan con el objetivo de controlar su dislipemia o como protección secundaria de eventos cardiovasculares. Sería necesaria la realización de ensayos clínicos con el objetivo de concluir si las estatinas consiguen tal efecto protector que compense la potencial iatrogenia en pacientes que no requieran su empleo con otra finalidad.

Bibliografía

1. Schmeer C, Kretz A, Isenmann S. Therapeutic potential of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors for the treatment of retinal and eye diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007; 6(4): 282-287. DOI: 10.2174/187152707781387260
2. Stein JD, Newman-Casey PA, Talwar N, Nan B, Richards JE, Musch DC. The relationship between statin use and open-angle glaucoma. *Ophthalmology*. 2012; 119(10): 2074-2081. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.04.029
3. Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Atherosclerosis y metabolismo lipoproteico. En: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, editores. *Farmacología*. 9ª ed. Barcelona: Elsevier; 2020. p.310-318.
4. Villarreal G Jr, Chatterjee A, Oh SS, Oh DJ, Rhee DJ. Pharmacological regulation of SPARC by lovastatin in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55(3): 1657-1665. DOI: 10.1167/iovs.13-12712
5. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic effects of statins on cardiovascular system. *Circ Res* 2017;120(1): 229-243. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308537
6. Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific Inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(5):1029-1037.
7. Martín PY, Piloto DI, Álvarez CG, Fumero GF, Rodríguez RD, Sánchez AL. Fisiología trabecular y glaucoma de ángulo abierto. *Rev Cuba Oftalmol*. 2012; 25(3): 458-466.
8. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014; 121:2081-2090. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013
9. Olson EA, Hainsworth DP, Davis G, Hagan JC. Eye on statins: a comprehensive review. *Mo Med*. 2013; 110(4): 344-348.
10. Wierzbowska J, Robaszkiewicz J, Figurska M, Stankiewicz A. Future possibilities in glaucoma therapy. *Med Sci Monit*. 2010; 16(11): 252-259.
11. Nagaoka T, Takahashi A, Sato E et al. Effect of systemic administration of simvastatin on retinal circulation. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(5):665-70. DOI: 10.1001/archophth.124.5.665
12. McCann P, Hogg RE, Fallis R, Azuara-Blanco A. The effect of statins on intraocular pressure and on the incidence and progression of glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(6): 2729-2748. DOI: 10.1167/iovs.15-18595
13. De Castro DK, Punjabi OS, Bostrom AG et al. Effect of statin drugs and aspirin on progression in open-angle glaucoma suspects using confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2007; 35: 506-513. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2007.01529.x

- 14.** Iskedjian M, Walker JH, Desjardins O et al. Effect of selected antihypertensives, antidiabetics, statins and diuretics on adjunctive medical treatment of glaucoma: a population based study. *Curr Med Res Opin.* 2009; 25(8): 1879-1888. DOI: 10.1185/03007990903035083.
- 15.** Owen CG, Carey IM, Shah S, et al. Hypotensive medication, statins, and the risk of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(7): 3524-3530. DOI: 10.1167/iovs.09-4821
- 16.** Khawaja AP, Chan MP, Broadway DC et al. Systemic medication and intraocular pressure in a British population: the EPIC-Norfolk Eye Study. *Ophthalmology.* 2014; 121: 1501-1507. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.02.009
- 17.** Ho H, Shi Y, Chua J, et al. Association of systemic medication use with intraocular pressure in a multiethnic asian population: The Singapore Epidemiology of Eye Diseases Study. *JAMA Ophthalmol.* 2017;135(3):196-202. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2016.5318
- 18.** Pappelis K, Loiselle AR, Visser S, Jansonius NM. Association of Systemic Medication Exposure With Glaucoma Progression and Glaucoma Suspect Conversion in the Groningen Longitudinal Glaucoma Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(14):4548-4555. DOI: 10.1167/iovs.19-27984
- 19.** McGwin G, McNeal S, Owsley C, Girkin C, Epstein D, Lee PP. Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122: 822-826. DOI: 10.1001/archophth.122.6.822
- 20.** Artes PH, Chauhan BC. Longitudinal changes in the visual field and optic disc in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 333–354. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.10.002
- 21.** Leung DY, Li FC, Kwong YY, Tham CC, Chi SC, Lam DS. Simvastatin and disease stabilization in normal tension glaucoma: a cohort study. *Ophthalmology.* 2010; 117: 471-476. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.08.016
- 22.** Marcus MW, Müskens RP, Ramdas WD, et al. Cholesterol-lowering drugs and incident open-angle glaucoma: a population-based cohort study. *PLoS ONE.* 2012; 7(1): e29724.
- 23.** Talwar N, Musch DC, Stein JD. Association of daily dosage and type of statin agent with risk of open-angle glaucoma. *JAMA Ophthalmol.* 2017; 135(3): 263-67. DOI: 10.1371/journal.pone.0029724
- 24.** Whigham B, Oddone EZ, Woolson S, et al. The influence of oral statin medications on progression of glaucomatous visual field loss: A propensity score analysis. *Ophthalmic Epidemiol.* 2018;25(3):207-214. DOI: 10.1080/09286586.2017.1399427
- 25.** Ooba N, Iwahashi R, Nogami A, et al. Comparison between high and low potency statins in the incidence of open-angle glaucoma: A retrospective cohort study in Japanese working-age population. *PLoS One* 2020;15(8):e0237617. DOI: 10.1371/journal.pone.0237617
- 26.** Shon K, Sung KR. Dyslipidemia, dyslipidemia treatment, and open-angle glaucoma in the Korean national health and nutrition examination survey. *J Glaucoma* 2019; 28(6): 550-556. DOI: 10.1097/IJG.0000000000001237
- 27.** Chen HY, Hsu SY, Chang YC, et al. Association between statin use and open-angle glaucoma in hyperlipidemia patients: a Taiwanese population-based case-control study. *Medicine.* 2015; 94(45): e2018. DOI: 10.1097/MD.0000000000002018
- 28.** Zacco A, Togo J, Spence K, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 2003; 23: 11104–11111. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-35-11104.2003
- 29.** Bösel J, Gandor F, Harms C, et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem.* 2005; 92(6): 1386-1398. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02980.x
- 30.** Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, et al. Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:1707–1713. DOI: 10.1001/archophth.120.12.1707

31. Song J, Deng PF, Stinnett SS, Epstein DL, Rao PV. Effects of cholesterol-lowering statins on the aqueous humor outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(7):2424-2432. DOI: 10.1167/iops.04-0776

32. Kotikoski H, Oksala O, Vapaatalo H, Aine E. Aqueous humour flow after a single oral dose of isosorbide-5-mononitrate in healthy volunteers. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003; 81(4): 355-360. DOI: 10.1034/j.1600-0420.2003.00109.x

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.21740

Artículos de revisión

Secreted Frizzled – Related Protein 4 y el cáncer de mama

Secreted Frizzled – Related Protein 4 and breast cancer

José María Gálvez-Navas^{1,2}  0000-0001-9225-8225

Cristina Pérez-Ramírez^{1,2}  0000-0002-3511-1312

MCarmen Ramírez-Tortosa^{1,2}  0000-0002-7999-0881

¹Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Granada, España.

²Universidad de Granada, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” (INYTA), Armilla, España.

Correspondencia

María del Carmen Ramírez Tortosa.
mramirez@ugr.es

Recibido: 08.07.2021

Aceptado: 03.09.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación

Conflicto de intereses

Ninguno

Agradecimientos

A Elena Picón Guglieri, ilustradora, por su colaboración en el diseño y realización de las figuras incluidas en este artículo.

Resumen

Introducción: el correcto funcionamiento y la supervivencia de la célula vienen mediados por multitud de procesos clave. El delicado equilibrio que se requiere entre dichos fenómenos hace que un error en los mecanismos de control desencadene el inicio de la carcinogénesis. Dentro de las rutas metabólicas encargadas de su regulación se encuentran las vías de señalización del Wnt. De esta forma, aquellas moléculas que intervengan en dichas vías presentarán un papel clave para el estudio de la patología, entre las que destaca secreted Frizzled – Related Protein 4 (sFRP4).

Método: se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en bases de datos de referencia, como es el caso de Medline, Scopus o Web of Science.

Resultados: a sFRP4 se le ha otorgado el papel de modulador negativo de las vías de Wnt debido a su capacidad de competir por los ligandos Wnt y evitar el inicio de dichas rutas. Por lo tanto, sFRP4 será esencial en el control del inicio y desarrollo del cáncer en aquellos tejidos donde se exprese la proteína, dentro de los que se considera el tejido mamario.

Conclusiones: los recientes estudios acerca de la implicación de sFRP4 en el desarrollo de diversas patologías, justifican que la proteína haya captado la atención en los últimos años. De esta forma, se puede afirmar que sFRP4 presenta un interesante potencial como biomarcador en el tratamiento, diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama, entre otras enfermedades.

Palabras clave: sFRP4; β – catenina; canónica; no canónica; Frizzled; cáncer de mama.

Abstract

Introduction: cell's correct functionality and surveillance are brokered by a wide range of essential proceedings. The delicate equilibrium required between those phenomenon means that an error in the control mechanisms provoke the carcinogenesis commencement. In those metabolic pathways in charge of controlling the mechanisms are found the Wnt signaling pathways. Therefore, molecules that interact with the pathways mentioned, where secreted Frizzled – Related Protein 4 is located, will play a key role in the pathology knowledge.

Method: a bibliographic research has been done in referral databases, such as Medline and Scopus.

Results: sFRP4 has been identified as a negative modulator of the Wnt signaling pathways. This is due to its capacity of competing for the Wnt ligands and avoiding the commencement of the pathways. Otherwise, sFRP4 is essential for the control of the cancer beginning and development in those tissues where the protein is expressed, being mammary tissues considered into them.

Conclusions: recent studies about the implications of sFRP4 in the development of several pathologies justify that the protein had garnered attention in recent years. Furthermore, it can be affirmed that sFRP4 presents an interesting potential as biomarker in the breast cancer treatment, diagnosis and prognosis, among other pathologies.

Keywords: sFRP4; β – catenin; canonical; non – canonical; Frizzled; breast cancer.

Puntos clave

Secreted Frizzled – Related Protein 4 es un glicoproteína que interviene como modulador negativo en las vías de señalización del Wnt, relacionada con el inicio y progresión del cáncer en aquellos tejidos donde se expresa, entre los que se considera el tejido mamario.

El estudio recoge y actualiza la información disponible acerca de la síntesis, estructura y función de sFRP4, así como su relación con el cáncer de mama.

Secreted Frizzled – Related Protein 4 está implicada en la génesis y progresión del cáncer de mama, aunque los estudios realizados sobre ello no permiten definirla como biomarcador de la enfermedad. Asimismo, nuevas líneas de investigación deben realizarse, dirigidas a elucidar las implicaciones de la glicoproteína en la patología.

Introducción

La familia de proteínas sFRP está compuesta por un total de cinco miembros, dentro de los cuales podemos considerar a secreted Frizzled – Related Protein 4 (sFRP4). Dichas glicoproteínas se expresan en una amplia variedad de tejidos humanos tanto a nivel embrionario como adulto⁽¹⁾.

El crecimiento celular, la proliferación, la migración, la diferenciación y la apoptosis son procesos fundamentales que tienen lugar en el ciclo vital de la célula para su correcto desarrollo natural. De esta forma, la ejecución errática de alguno de estos mecanismos puede desencadenar la carcinogénesis celular^(2,3,4). Es por ello, que las diversas rutas metabólicas implicadas en dichos procesos serán claves, así como las moléculas que intervengan en su control. De esta forma, tanto la cascada de señalización del Wnt como las proteínas de la familia sFRP desempeñarán un papel crítico en la patología del cáncer. Inicialmente, dichas glicoproteínas fueron definidas como “supresores tumorales” debido a su actividad como antagonistas de las vías de señalización mencionadas. Esto se debe a la actuación de las proteínas sFRPs como moduladores de las vías del Wnt, mediante la competición con el receptor Frizzled (FZD) por los ligandos Wnt^(4,5).

Métodos

En el período de marzo-junio de 2021 se hizo una búsqueda en las bases de datos *Medline*, *Scopus* y *Web of Science*, utilizando las palabras clave: “sFRP4”, “breast cancer”, “treatment” y “Wnt pathways”, utilizando el operador booleano “AND”. De la totalidad de los artículos encontrados se seleccionaron aquellos de interés en el tema de revisión, redactados en inglés y en los que se tuvo acceso al texto completo como criterios de exclusión o inclusión.

Resultados

Esta parte del artículo se estructuró en los siguientes apartados: familia de Secreted Frizzled – Related Proteins, vías de señalización del Wnt y sFRP4, sFRP4 en el cáncer de mama y sFRP4 y el tratamiento del cáncer de mama

Familia de Secreted Frizzled – Related Proteins

La familia de glicoproteínas sFRP está conformada por un total de cinco miembros (sFRP1 – sFRP5), dentro de la cual se puede realizar una subdivisión atendiendo a la homología entre ellos. Por un lado, se encuentra la subfamilia 1Sarp, constituida por sFRP1, sFRP2 y sFRP5. Por otro lado, son sFRP3 y sFRP4 quienes conforman la subfamilia 2FrzB^(5,6). Con respecto a su actividad, esta familia se ve encuadrada dentro de los “antagonistas de la vía de señalización del Wnt”⁽⁷⁾.

El silenciamiento del gen 8p11.21 en pacientes diagnosticados de cáncer de mama y de colon permitió la determinación del primer miembro de esta familia, sFRP1^(4,5). Dicho gen codifica para una glicoproteína de 314 aminoácidos (aa) capaz de establecer puentes disulfuro con el receptor FZD^(8,9). Comparando con el resto de miembros, ésta presenta una mayor homología con sFRP5^(4,10). El segundo miembro, sFRP2, viene codificado por el gen 4q31.3, que da lugar a una proteína de 300 aa aproximadamente^(5,11). La expresión de esta suele ocurrir a nivel del estroma tumoral en la mayoría de tipos de cáncer, al igual que sucede con su hermana sFRP4^(4,12). Por su parte, sFRP3 viene codificada por el gen 2q32.1⁽⁵⁾. Esta glicoproteína fue uno de los primeros miembros de la familia en determinarse, que inicialmente se denominó FRZB debido a su actividad como antagonista de la vía de señalización del Wnt⁽¹³⁾. sFRP3 actúa regulando la polaridad epitelial, además de presentar un papel fundamental en la homeostasis del hueso y del cartílago^(14,15). El último miembro de la familia, sFRP5, viene codificado por el gen 10q24.2⁽⁵⁾. La inhibición de la expresión de esta glicoproteína se encuentra relacionada con una gran variedad de patologías cancerígenas, como son el cáncer de próstata, el cáncer ovárico epitelial⁽¹⁶⁾ o el cáncer de mama, siendo incierto el papel de ésta en el melanoma⁽¹⁷⁾. La expresión de ésta se ve disminuida en la mayoría de tumores primarios, al igual que ocurre con su hermana sFRP1^(4,18).

Estructura y localización genética y celular de sFRP4

sFRP4 se determinó por primera vez en 1997 de manos de Wolf y su equipo. En la literatura científica se pueden encontrar otras referencias a esta glicoproteína como FRP – 4, frpHE (FRP Human Endometrium), LOC6426, MGC26498 y FRZB2. Esta última denominación se debe a su homología (48,6%) con sFRP3 (FRZB1). Asimismo, sFRP4 es el miembro más conocido de la familia, la cual presenta diferencias fundamentales con el resto basadas en la presencia de seis residuos de cisteína unida mediante puentes disulfuro^(5,19).

Estructuralmente, la proteína se caracteriza por estar conformada por un total de 364 aa y presentar un peso molecular aproximado de 39,9 kDa^(5,19). Los plegamientos conformacionales posteriores a la síntesis de la proteína dan como resultado dos dominios independientes. Por un lado, encontramos el CRD, constituido por 110 – 120 aa y cuya fracción terminal guarda un 30% de homología con el dominio localizado en los receptores FZD. Ello se debe a la presencia de 10 residuos de cisteína en ambos dominios^(5,19,20). Por otro lado, en el dominio NTR o NDL se aprecia una región de elevado contenido en serina y treonina. Este dominio es la diana perfecta para la acción de serina o treonina quinasas, al componerse de varios lugares de fosforilación serina/treonina (9 en el caso de los humanos). Además, los seis residuos de cisteína presentes en el dominio permiten el establecimiento de tres puentes disulfuro^(5,6,21), ver **figura 1**.

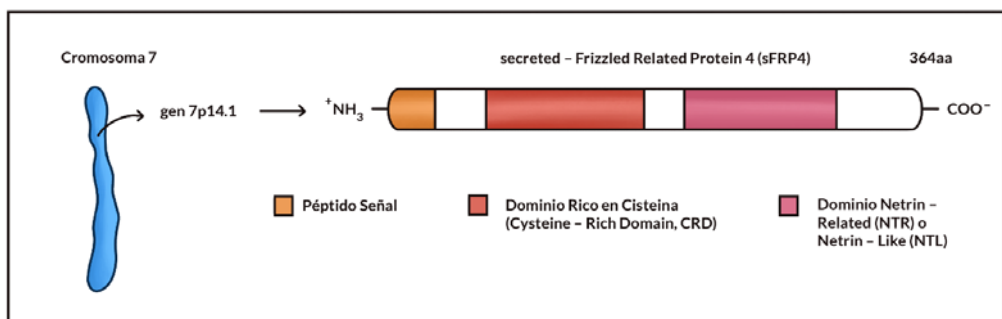


Figura 1. Representación de la localización genética del gen 7p14.1 y la estructura de la proteína sFRP4. En ella se aprecian dos dominios independientes y un péptido señal, que indica que ésta es una proteína secretada.

Este gen codificante para sFRP4 presenta tres transcritos y se asocia con 29 fenotipos^(5,19,22). Además, cuenta con la presencia de seis exones y una longitud de 10,99 kb, siendo dentro del primer exón donde se localiza el codón de iniciación para la traducción. Por otro lado, la transcripción del gen ocurre desde el telómero hacia el centrómero, es decir, en sentido opuesto^(5,19,22,23). Como producto de dicho proceso se obtiene un transcrito primario que cuenta con 2974 pares de bases (pb), de las cuales, 1041 pb conforman la secuencia codificante o mRNA maduro^(5,19,22), ver **figura 1**.

La expresión de sFRP4 viene regulada mediante estrógenos y progesterona, de manera que podría intervenir en la morfología y función uterina⁽²⁴⁾. Por su parte, dicha proteína cuenta con una amplia presencia a nivel de tejidos humanos, destacando principalmente el estroma endometrial (existe una mayor expresión de la misma en la fase proliferativa del ciclo menstrual), ovario, riñón, cerebro, glándulas mamarias, cérvix, páncreas, estómago, colon y pulmón^(5,24). A nivel celular, la síntesis de sFRP4 ocurre en el núcleo, mientras que las modificaciones posteriores y su almacenamiento se suceden en el retículo endoplasmático perinuclear. Con respecto a la secreción de la proteína, ésta tiene lugar mediante vesículas procedentes del retículo y dirigidas hacia la membrana celular. Tanto la localización celular como la secreción de sFRP4 están mediadas por el ligando Wnt3a. La presencia de éste se traduce en la formación de agregados oligoméricos entre sFRP4 y CRD en la región perinuclear y, por ende, se da una redistribución intracelular de la proteína^(19,25).

Vías de señalización del Wnt y sFRP4

Desde el descubrimiento del primer gen codificante para Wnt (Wnt1) hasta hoy, se ha logrado identificar un total de 19 genes que codifican para estas glicoproteínas. La familia de proteínas Wnt presenta un alto grado de conservación a través de la evolución, desde el género *Drosophila*, hasta los vertebrados. Estas proteínas son fundamentales para el correcto desarrollo embrionario y el mantenimiento de la homeostasis en el adulto^(7,26). La familia de ligandos Wnt hace referencia a un conjunto de glicoproteínas solubles que se caracterizan por unirse con receptores FZD, principalmente, y correceptores LRP5/6 (proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, LDL)⁽⁷⁾. Su actividad se centra en el inicio de una cascada de señalización donde la β - catenina juega un papel clave, diferenciando entre la vía canónica (dependiente de la β - catenina) y la vía no canónica (independiente de la β - catenina)⁽²⁷⁾.

Por su parte, los receptores FZD se integran dentro de una familia de proteínas constituidas por siete dominios transmembrana (7TM), los cuales se caracterizan por presentar CRDs en su fracción extracelular (N - terminal). Estos dominios son, de hecho, el lugar de unión de los ligandos Wnt a este receptor^(6,28).

Vía Canónica

En la vía canónica, cuando el ligando Wnt no inicia la cascada, la β - catenina es objeto de fosforilación por acción del complejo proteico de destrucción. Este está constituido por la unión de las proteínas de andamiaje APC y Axina; las proteínas quinasas CK1 y GSK3 β , y la E-3 ubiquitina ligasa β - TrCP^(29,30,31). Ello permite actuar a la ubiquitina ligasa β - TrCP sobre la β - catenina, de manera que podrá ser degradada por el proteasoma^(32,33). De esta forma, los factores de transcripción TCF/LEF reprimen los genes diana de la β - catenina mediante el reclutamiento de correceptores Groucho⁽³⁴⁾. Por otro lado, cuando el ligando Wnt se une al FZD y su correceptor LRP5/6, la vía se activa. Así, la proteína citoplasmática de andamiaje Dishevelled (Dvl) recluta a la Axina y permite la fosforilación del extremo citoplasmático del correceptor LRP5/6^(29,35,36,37,38). Como resultado de ello se da la acumulación citoplasmática de la β - catenina y la translocación al núcleo de la misma, uniéndose a TCF/LEF y desplazando a los represores Groucho^(29,34,29). Todo ello, junto con el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como BCP y Pygo/Bcl - 9⁽⁴⁰⁾, permite la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis como CCND1, MYC, axina2, DKK1 o LEF1^(30,33), ver **figura 2**.

Vía no canónica

La vía no canónica suele iniciarse mediante los ligandos Wnt5a y Wnt11⁽⁷⁾. Dentro de ella, podemos diferenciar entre la vía del Calcio (Ca²⁺) y la vía de la Prioridad Celular Planar (PCP)^(32,40). La primera de ellas se puede activar por unión del Wnt a FZD o bien al receptor ROR2 (*tyrosine kinase – like orphan receptor – 2*)⁽⁴¹⁾. Ello se traduce en una activación de las proteínas G, que actúan sobre la PLC, aumentando los niveles citoplasmáticos de DAGs (diacilglicéridos) e IP3 (inositol trifosfato). Por su parte, el IP3 difunde hasta el retículo endoplasmático liso (*smooth endoplasmic reticulum*, SER), permitiendo la liberación del Ca²⁺ contenido en éste^(42,43,44). Cabe destacar que, el aumento del Ca²⁺ puede darse como resultado de la inhibición de la proteína quinasa G (PKG) mediante la acción de la proteína p38^(33,45). El Ca²⁺ activa a la calcio/calmodulina dependiente de quinasa II (CaMKII) y, por ende, a la calcineurina, la cual interviene en la activación del NFAT (*nuclear factor of activated T cells*)^(44,46). Por su parte, la actuación de los DAGs activa a la proteína quinasa C (PKC) a nivel de la membrana y como resultado de ello, el IκB actúa sobre el factor nuclear κB (NF – κB). Este último migrará al núcleo, de manera que, junto con el NFAT, intervendrán como factores de transcripción^(32,43), ver **figura 2**.

Por otro lado, la vía PCP se inicia cuando la unión de Wnt al FZD activa a las proteínas de unión a GTP RhoA y Rac, así como a sus quinasas efectoras: Rho – quinasa y JNK, promoviendo su translocación al núcleo^(40,47). La vía se ve interrumpida por la acción las proteínas Van Gogh (Vangl) y Prickle (Pk)^(35,48), ver **figura 2**. Esta vía se asocia con la reordenación del citoesqueleto y adhesión celular, regulando los movimientos de la célula y su disposición^(35,40). Es importante mencionar que la cascada no tiene porqué ser estrictamente a nivel epitelial⁽²⁸⁾.

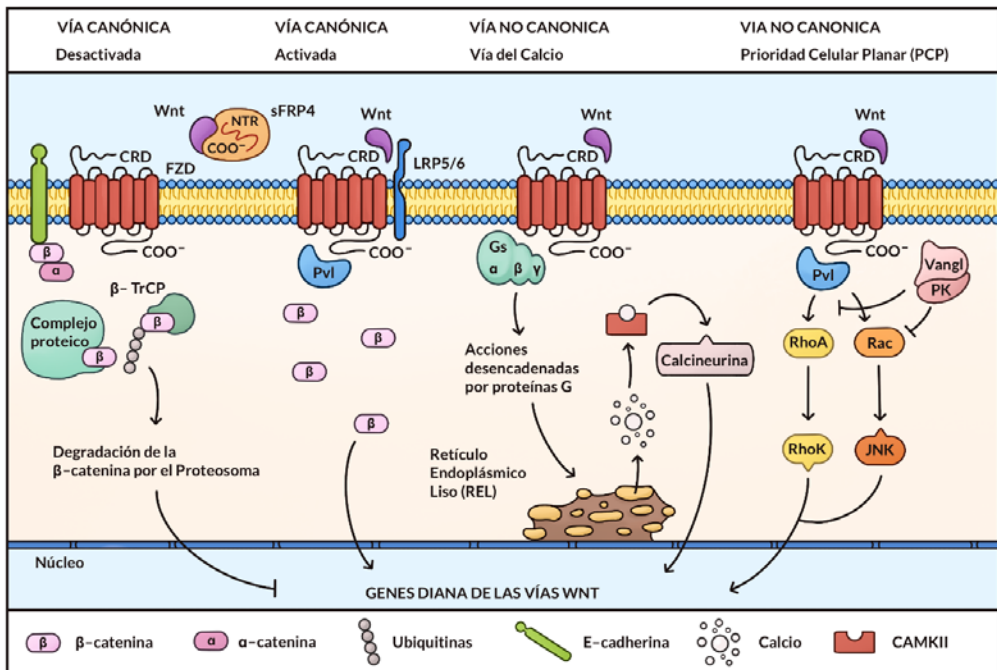


Figura 2. Representación de las vías de señalización del Wnt. Se aprecian la vía canónica (en su estado activo e inactivo) y la vía no canónica (vía del calcio y de la Prioridad Celular Planar, PCP).

Mecanismos de acción de sFRP4

Las modificaciones conformacionales posteriores a la síntesis de sFRP4 dan lugar a una homología del 30% entre los sitios de unión de los receptores FZD para los ligandos Wnt y los CRD de la proteína^(19,20,24). En la actividad de sFRP4 se requieren la presencia tanto del dominio CRD como del NTR. Con respecto al papel del primero, es el lugar por el cual se establece la unión entre los ligandos Wnt y la glicoproteína mediante la formación de puentes disulfuro. Por otro lado, la importancia del dominio NTR radica en que éste es el encargado de conferir estabilidad a la estructura proteica, permitiendo así una unión eficaz^(5,6).

La homología existente entre el CRD de los receptores FZD y sFRP4 permite a los ligandos Wnt la capacidad de unirse tanto al receptor como a la proteína. De esta forma, en caso de que se establezca la unión con ésta última, no se desencadenará el inicio de la cascada de señalización del Wnt. Todo ello hace que se le atribuya a sFRP4 la función de inhibidor o modulador negativo de la vía, principalmente^(5,37,49,50,51). Así mismo, se afirma que sFRP4 interviene como regulador competitivo en la vía de señalización del Wnt⁽⁵²⁾. Por otro lado, existen estudios que sugieren que sFRP4 se puede comportar como un complejo proteico⁽⁴⁾. Atendiendo a dicha afirmación, se apunta que la actividad de la proteína va más allá de la inhibición de dicha vía, pudiendo actuar del mismo modo como transportador de proteínas o de ligandos Wnt de amplio rango. Es decir, llevando los ligandos de zonas con menor densidad de receptores, a aquellas donde existe una mayor concentración de los mismos^(4,5).

Según los trabajos de Pawar & Rao y Claudel *et al.*, se pueden resumir los diversos mecanismos de acción de sFRP4 como modulador de la vía de señalización del Wnt en los siguientes puntos.

- a. La interacción de sFRP4 con el ligando Wnt a través de cualquiera de los dos dominios se conoce como antagonismo clásico.
- b. A bajas concentraciones de sFRP4 se ha apreciado un aumento de la actividad de la cascada de señalización del Wnt. Dicho fenómeno tiene lugar mediante un mecanismo todavía desconocido.
- c. La inhibición del inicio de la cascada de señalización del Wnt se puede llevar a cabo por la formación de complejos inactivos entre los receptores FZD y sFRP4.
- d. La unión simultánea del ligando Wnt a sFRP4 y el receptor FZD favorece la señal de transducción.

De esta forma, se puede apreciar que sFRP4 interviene en la regulación de tres vías metabólicas relacionadas con el Wnt, como son la vía canónica, la vía no canónica del calcio y la vía no canónica PCP. Por otro lado, se ha observado que las proteínas sFRP son capaces de interactuar con otras moléculas diferentes a las que intervienen en las vías del Wnt, como es el caso de la BMP (*bone morphogenetic protein*)⁽⁵⁾.

sFRP4 en el cáncer de mama

La génesis tumoral requiere de multitud de procesos celulares como son el desarrollo, la proliferación, la migración y la apoptosis; en los cuales las vías de señalización del Wnt presentan un papel clave^(2,3,7). Por ello, se puede afirmar la existencia de una correlación entre la cascada de señalización del Wnt y el cáncer de mama en humanos^(7,53). Además, se ha descrito que sFRP4 es una pieza clave para el inicio de la apoptosis en el cáncer de mama a través de la inhibición de la vía de señalización Akt/PKB, la cual bloquea la apoptosis^(2,3).

El medio condicionante tumoral (*tumour conditioned medium*, TCM) que conforma el microambiente es necesario para que se den los cambios adecuados en la morfología y la función de aquellos componentes celulares no cancerígenos que rodean al tumor, como es el caso de las células madre mesenquimales, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos. Como resultado de la presencia de este TCM, se originan fibroblastos asociados al tumor (*tumour – associated fibroblasts*, TAFs), los cuales contribuyen a la progresión y metástasis tumoral⁽⁵⁴⁾. Debido a las diversas propiedades que presenta sFRP4 (antitumorales, antiangiogénicas y propoapoptóticas) se ha demostrado que la proteína juega diferentes papeles en el desarrollo del cáncer de mama⁽⁵⁵⁾. Como ejemplo de dicha

intervención, se ha observado que sFRP4 interfiere en la diferenciación de las células madre adiposas derivadas del tejido mesenquimal (*adipose derived mesenchymal stem cells*, ADMSCs), evitando que éstas muestren un fenotipo carcinogénico y favoreciendo la respuesta al tratamiento^(54,55).

El desencadenamiento de la carcinogénesis se asocia con eventos erráticos ocurridos a nivel genético y epigenético^(24,56). El mecanismo por el que los niveles de sFRP4 se ven disminuidos en el cáncer de mama es la hipermetilación del promotor, debido a un fallo en la actividad del enzima DNA metiltransferasa 1 (DNMT1). Como consecuencia de ello, la pérdida de las funciones contribuye a la activación de la vía del Wnt en la génesis tumoral mamaria^(1,24,57). En resumen, se afirma que **la metilación del promotor conlleva una disminución en la expresión de sFRP4**.

Por su parte, la complejidad etiológica que presenta el cáncer de mama, donde intervienen multitud de procesos, hace que sFRP4 presente varios frentes de actuación en los que su papel puede ser clave^(6,58). Atendiendo a diversos estudios *in vitro* realizados sobre tejidos cancerígenos de diverso tipo, entre ellos el tejido mamario; existe una disminución en la expresión de sFRP4 en dicha enfermedad. De esta forma, un aumento en los niveles de la proteína se tradujo en una reversión de la patología^(6,7,55). Sin embargo, se ha podido determinar que, en ciertos casos, un aumento en la expresión no se corresponde necesariamente con la apoptosis celular o con una disminución de los mecanismos anteriores. Esto puede deberse a la implicación de sFRP4 en otras vías de señalización⁽⁵⁵⁾. Todo ello lleva a pensar que **una disminución en la expresión de sFRP4 se asocia con la aparición del cáncer de mama**.

Finalmente, se ha observado que en concentraciones crecientes de glucosa sFRP4 interviene de forma negativa tanto en la adhesión, como en la capacidad de renovación de las células madre cancerosas (CSCs). Esto indica que la acción antiproliferativa de sFRP4 es independiente de aquellos nutrientes exógenos que son clave para el microambiente. Por otro lado, la acción de la proteína disminuye el ratio NAD⁺/NADH, haciendo a las CSCs más susceptibles al estrés inducido por las especies reactivas de oxígenos (EROs). Así mismo, sFRP4 es capaz de intervenir en el metabolismo de la glutamina, disminuyendo por tanto la secreción de glutamato⁽⁵⁵⁾. Todos estos mecanismos permiten afirmar que sFRP4 altera el metabolismo de las células madre cancerosas.

sFRP4 y el tratamiento del cáncer de mama

En el tratamiento del cáncer de mama se pueden seguir diversas estrategias. La principal de ellas es la cirugía, la cual se suele combinar con quimioterapia, radioterapia u hormonoterapia. Sin embargo, los numerosos efectos adversos y la posibilidad de desarrollar resistencia al tratamiento, hacen que los esfuerzos científicos se dirijan a buscar tratamientos que aborden la patología de una forma más específica^(44,59,60).

Desde el descubrimiento de sFRP4, esta proteína se ha asociado con el inicio y el desarrollo del cáncer⁽⁵⁵⁾. De acuerdo con dicha afirmación, existen estudios que se han focalizado en dicha proteína y el tratamiento del cáncer de mama. Siguiendo esta línea, se ha descrito un aumento de la apoptosis como resultado de la intervención de sFRP4 en el ciclo celular de las células cancerosas^(2,3,61). Dicha actividad se ve incrementada cuando la proteína se asocia con tratamiento quimioterápico. Ello se debe a un aumento en la actividad de la caspasa3, de manera que se aprecia un deterioro importante en las membranas mitocondriales de las CSCs. Todo ello indica que las células se encuentran próximas a la muerte. Además, sFRP4 actúa promoviendo la expresión de genes proapoptóticos (Bax) y disminuyendo la de genes antiapoptóticos (Bcl - x1), así como la de genes procarcinogénicos (ABCG2, CNDD1)⁽⁶¹⁾.

Por su parte, el uso de los ligandos Wnt y sus receptores como diana terapéutica demostró eficacia en modelos humanos y animales, aunque sus efectos en la metástasis del cáncer de mama no son contundentes⁽⁷⁾. Así mismo, se ha llegado a establecer una correlación entre el papel que desempeñan las CSCs en el inicio y desarrollo de la enfermedad con la vía de señalización del Wnt^(44,61,62). Las CSCs se caracterizan por encontrarse formando agregados, que dan lugar a estructuras esféricas. De esta forma, se ha visto que el tratamiento de sFRP4 en combinación con los quimioterápicos doxorubicina y cis - platino da como resultado la segregación de dichas estructuras y una disminución en el número

de receptores en la membrana. Por lo tanto, se puede afirmar que sFRP4 permite a los agentes quimioterápicos que actúen inhibiendo la proliferación⁽⁶¹⁾.

Anteriormente se ha apuntado que la disminución de la expresión de sFRP4 se debe a la hipermetilación del promotor por acción errática de la DNMT1^(1,24,57). De este modo, se ha obtenido una disminución de la supervivencia de las CSCs tumorales y una menor progresión de la enfermedad a través del aumento de la expresión de sFRP4 mediante el uso de agentes desmetilantes, como la 5 – azacitidina⁽¹⁾.

Finalmente, la diosgenina (DG) es una saponina esteroídica que se encuentra de forma natural en plantas como el ñame o el fenogreco y que se caracteriza por presentar propiedades antitumorales en determinados tipos de cáncer. Este fenómeno tiene su explicación en la activación de la proteína p53 y la vía de las caspasas. Por su parte, el tratamiento de CSCs procedentes de tumores mamarios, mediante la combinación de sFRP4 y DG como agentes terapéuticos, se tradujo en una disminución de la supervivencia de las células y una menor progresión de la enfermedad⁽⁶³⁾.

Conclusión

La etiología del cáncer de mama es muy compleja debido a su perfil multifactorial, en el que convergen multitud de procesos. Todo ello, junto con los diversos efectos adversos que presenta el tratamiento de la enfermedad; justifica que los esfuerzos científicos se dirijan en el avance hacia una medicina cada vez más personalizada y menos invasiva. Dichos avances se basan en el conocimiento de las bases moleculares de las distintas patologías. En relación al cáncer, uno de los mecanismos celulares que desempeña un papel fundamental en el inicio y desarrollo de la patología es la cascada de señalización del Wnt. Dentro de los inhibidores de dicha vía se localiza la glicoproteína sFRP4, aunque el mecanismo de acción de ésta no está definido por completo. De esta forma, apreciamos que un mayor estudio de las bases moleculares del cáncer de mama y la vía del Wnt, así como del mecanismo de acción de sFRP4; supondrá un gran avance en aras de alcanzar un tratamiento médico más personalizado.

Con objeto de conocer las bases moléculas de las enfermedades y las posibles alternativas para su tratamiento, tanto la genética como la epigenética están adquiriendo una relevancia destacable en la actualidad. Se ha observado que la disminución en la expresión de sFRP4 se debe a la hipermetilación del promotor como resultado de la actividad errónea de la DNMT1. Así mismo, se ha observado que sFRP4 es un elemento crítico para el inicio y la progresión de la enfermedad a nivel del tejido mamario. De igual forma, la asociación de la proteína con los agentes quimioterápicos destinados al tratamiento del cáncer de mama ha supuesto una sinergia en los efectos, obteniendo resultados notables. Sin embargo, el número de investigaciones en las que se relaciona a sFRP4 con el cáncer de mama no son suficientes para considerar a dicha proteína como biomarcador de la enfermedad. Debido al gran potencial de sFRP4, futuras líneas de investigación dirigidas hacia la determinación de sFRP4 como biomarcador, realizadas en tejidos humanos, cultivos celulares o líneas celulares humanas; así como la modificación epigenética de su expresión, serán de gran aporte científico para el avance en el tratamiento, diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama.

Bibliografía

1. Deshmukh A, Arfuso F, Newsholme P, Dharmarajan A. *Epigenetic demethylation of sFRPs, with emphasis on sFRP4 activation, leading to Wnt signaling suppression and histone modifications in breast, prostate, and ovary cancer stem cells.* Int J Biochem Cell Biol. 2019; 109:23–32. doi: 10.1016/j.biocel.2019.01.016
2. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramírez-Tortosa C, et al. *Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours.* Mol Nutr Food Res. 2011; 55(1):117–126. doi: 10.1002/mnfr.201000220
3. Pohl S, Scott R, Arfuso F, Perumal V, Dharmarajan A. *Secreted frizzled – related protein 4 and its implications in cancer and apoptosis.* Tumor Biol. 2014; 36(1):143–152. doi: 10.1007/s13277-014-2956-z

4. Vincent KM, Postovit L M. *A pan – cancer analysis of secreted Frizzled – related proteins: re – examining their proposed tumour suppressive function.* Sci Rep. 2017; 7:42719. doi: 10.1038/srep42719
5. Pawar NM, Rao P. *Secreted frizzled – related protein 4 (sFRP4) update: A brief review.* Cell Signal. 2018; 45:63–70. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.01.019
6. Vincent KM, Postovit LM. *Matricellular proteins in cancer: a focus on secreted Frizzled – related proteins.* J Cell Commun. 2018; 12(1):103–112. doi: 10.1007/s12079-017-0398-2
7. Yin P, Wang W, Zhang Z, Bai Y, Gao J, Zhao C. *Wnt signaling in human and mouse breast cancer: Focusing on Wnt ligands, receptors and antagonists.* Cancer Sci. 2018; 109(11):3368–3375. doi: 10.1111/cas.13771
8. Wu K, Li Z H, Yi W, et al. *Restoration of secreted frizzled-related protein 1 suppresses growth and increases cisplatin sensitivity in laryngeal carcinoma cells by downregulating NHE 1.* Int J Clin Exp Pathol. 2017; 10(8):8334–8343.
9. Baharudin R, Yew Fu Tieng F, Lee LH, Saykima Ab Mutalib N. *Epigenetics of SFRP1: The Dual Roles in Human Cancers.* Cancers. 2020; 12 (445):1–20. doi: 10.3390/cancers12020445
10. Yu J, Xie Y, Li M, et al. *Association between SFRP promoter hypermethylation and different types of cancer: A systematic review and meta-analysis.* Oncol Lett. 2019; 18(4):3481–3492. doi: 10.3892/ol.2019.10709
11. Liu Y, Zhou Q, Zhou D, Huang C, Meng X, Li J. *Secreted frizzled-related protein 2-mediated cancer events: Friend or foe?* Pharmacol Rep. 2017; 69(3):403–408. doi: 10.1016/j.pharep.2017.01.001
12. Huang C, Ye Z, Wan J, et al. *Secreted Frizzled – Related Protein 2 Is Associated with Disease Progression and Poor Prognosis in Breast Cancer.* Dis Markers. 2019:1– 8. doi: 10.1155/2019/6149381
13. Bernascone I, González T, Barea MD, et al. *Sfrp3 modulates stromal-epithelial crosstalk during mammary gland development by regulating Wnt levels.* Nat Commun. 2019; 10(1):1–17. doi: 10.1038/s41467-019-10509-1
14. Bravo D, Salduz A, Shogren KL, et al. *Decreased local and systemic levels of sFRP3 protein in osteosarcoma patients.* Gene. 2018; 674:1–7. doi: 10.1016/j.gene.2018.06.059
15. Claudel M, Jouzeau JY, Cailotto F. *Secreted Frizzled – related proteins (sFRPs) in osteoarticular diseases: much more than simple antagonists of Wnt signaling?* The FEBS J. 2019; 286(24):4832–4851. doi: 10.1111/febs.15119
16. Chen Y, Zou D, Wang N, et al. *SFRP5 inhibits the migration and invasion of melanoma cells through Wnt signaling pathway.* Onco Targets Ther. 2018; 11:8761–8772. doi: 10.2147/OTT.S181146
17. Xu Q, Lü Z, Wang X, Zhu Q, Wu H. *Secreted frizzled – related protein 5 suppresses aggressive phenotype and reverses docetaxel resistance in prostate cancer.* J Investig Med. 2019; 67(6):1009–1017. doi: 10.1136/jim-2018-000849
18. Lin HW, Fu C-F, Chang MC, et al. *CDH1, DLEC1 and SFRP5 methylation panel as a prognostic marker for advanced epithelial ovarian cancer.* Epigenomics. 2018; 10(11):1397–1413. doi: 10.2217/epi-2018-0035
19. Bukhari SA, Yasmin A, Zahoor MA, Mustafa G, Sarfraz I, Rasul A. *Secreted frizzled – related protein 4 and its implication in obesity and type – 2 diabetes.* Life. 2019; 71(11):1701–1710. doi: 10.1002/iub.2123
20. Azuma K, Zhou Q, Kubo K. *Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence – accelerated mouse prone 6 (SAMP6).* Med Mol Morphol. 2018; 51:139–146. doi: 10.1007/s00795-018-0188-9.
21. Bergmann K, Sypniewska G. *Secreted frizzled – related protein 4 (SFRP4) and fractalkine (CX3CL1) – Potential new biomarkers for β – cell dysfunction and diabetes.* Clin Biochem. 2014; 47(7–8):529–532. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.03.007

22. Gene: SFRP4 (ENSG00000106483) – Marked – up Sequence – Homo sapiens – Ensembl Genome Browser 91. [monografía en Internet]. Granada: Ensembl.org.; 2021 [acceso 30 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000106483;r=7:37905932-38025695.
23. Kitazawa S, Haraguchi R, Kitazawa R. *Morphology – oriented epigenetic research*. *Histochem Cell Biol*. 2018; 150(1):3–12. doi: 10.1007/s00418-018-1675-8
24. Carmon KS, Loose DS. *SFRP4 (Secreted Frizzled – Related Protein 4)*. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol*. 2010; 14 (3): 296 – 300.
25. Perumal V, Krishnan K, Gratton E, Dharmarajan AM, Fox SA. *Number and brightness analysis of sFRP4 domains in live cells demonstrates vesicle association signal of the NLD domain and dynamic intracellular responses to Wnt3a*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 64:91–96. doi: 10.1016/j.biocel.2015.03.010
26. Wilson DH, Jarman EJ, Mellin RP, et al. *Non – canonical Wnt signaling regulates scarring in biliary disease via the planar cell polarity receptors*. *Nat Commun*. 2020; 11(1):11–13. doi: 10.1038/s41467-020-14283-3
27. Cassuto J, Folestad A, Göthlin J, Malchau H, Kärrholm J. *The key role of proinflammatory cytokines, matrix proteins, RANKL/OPG and Wnt/ β – catenin in bone healing of hip arthroplasty patients*. *Bone*. 2017; 107:66–77. doi: 10.1016/j.bone.2017.11.004
28. Yang S, Wu Y, Xu TH, et al. *Crystal structure of the Frizzled 4 receptor in a ligand-free state*. *Nature*. 2018; 560(7720):666–670. doi: 10.1038/s41586-018-0447-x
29. Nusse R, Clevers H. *Wnt/ β – Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. *Cell*. 2017; 169(6):985–999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016
30. Steinhart Z, Angers S. *Wnt signaling in development and tissue homeostasis*. *Development*. 2018; 145(11):1–8. doi: 10.1242/dev.146589
31. Galluzzi L, Spranger S, Fuchs E, López – Soto A. *WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance*. *Trends Cell Biol*. 2019; 29 (1): 44 – 65. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.12.005
32. Chae W-J, Bothwell ALM. *Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells*. *Trends Immunol*. 2018; 39(10):830–847. doi: 10.1016/j.it.2018.08.006
33. van Schie EH, van Amerongen R. *Aberrant Wnt/CTNNB1 Signaling as a Therapeutic Target in Human Breast Cancer: Weighing the Evidence*. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 25. doi: 10.3389/fcell.2020.00025
34. Zhang S, Lin H, Kong S, et al. *Physiological and molecular determinations of embryo implantation*. *Mol Asp Med*. 2013; 34(5):939–980. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.011
35. Gao C, Chen YG. *Dishevelled: The hub of Wnt signaling*. *Cell Signal*. 2010; 22(5):717–727. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.11.021
36. Taciak B, Puszynska I, Kiraga L, Bialasek M, Krol M. *Wnt signaling pathway in development and cancer*. *J Physiol Pharmacol*. 2018; 96(2):185–196. doi: 10.26402/jpp.2018.2.07
37. van Andel H, Kocemba KA, Spaargaren M, Pals ST. *Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanism and targeting options*. *Leukemia*. 2019; 33(5):1063–1075. doi: 10.1038/s41375-019-0404-1
38. Zhong Z, Virshup DM. *Wnt Signaling and Drug Resistance in Cancer*. *Mol Pharmacol*. 2020; 97(2):72–89. doi: 10.1124/mol.119.117978
39. Duchartre Y, Kim Y M, Kahn M. *The Wnt signaling pathway in cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 99:141–149.
40. Katoh M. *Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review)*. *Int J Oncol*. 2017; 51(5):1357–1369. doi: 10.3892/ijo.2017.4129

41. Nishita M, Saji T, Minami Y. [Non – canonical Wnt signaling and celular responses]. *Clin Calcium*. 2019; 29(3):291–297. doi: 10.20837/4201903291
42. Flores-Hernández E, Velázquez DM, Castañeda-Patlán MC, Fuentes-García G, Fonseca-Camarillo G, et al. *Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells*. *Cell Signal*. 2020; 72: 109636.
43. Amal H, Gong G, Gjonjeska E, Lewis S M, Wishnok JS, et al. *S-nitrosylation of E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 alters non-canonical Wnt/Ca²⁺ signaling in the P301S mouse model of tauopathy*. *Transl Psychiatry*. 2019; 9(1):44. doi: 10.1038/s41398-019-0388-7
44. Li X, Ortiz M A, Kotula L. *The physiological role of Wnt pathway in normal development and cancer*. *Exp Biol Med*. 2020; 245(5):411–426. doi: 10.1177/1535370220901683
45. Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y. *Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts*. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75(20):3683–3692. doi: 10.1007/s00018-018-2881-1
46. Corda G, Sala A. *Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage*. *Oncogenesis*. 2017;6(7):e364. doi: 10.1038/oncsis.2017.69
47. López-Escobar B, Caro-Vega JM, Vijayraghavan D S, et al. *The non – canonical Wnt – PCP pathway shapes the mouse caudal neural plate*. *Development*. 2018; 145(9):1–15. doi: 10.1242/dev.157487
48. Wang M, Marco P, Capra V, Kibar Z. *Update on the Role of the Non-Canonical Wnt/Planar Cell Polarity Pathway in Neural Tube Defects*. *Cells*. 2019; 8(10):1198. doi: 10.3390/cells8101198
49. Zhan T, Rindtorff N, Boutrons M. *Wnt signaling in cancer*. *Oncogene*. 2017; 36(11):1461–1473. doi: 10.1038/onc.2016.304
50. Mäkitie RE, Constantini A, Kämpe A, Alm JJ, Mäkitie O. *New Insights Into Monogenic Causes of Osteoporosis*. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 70. doi: 10.3389/fendo.2019.00070
51. Mandal S, Gamit N, Varier L, Dharmarajan A, Warriar S. *Inhibition of breast cancer stem – like cells by a triterpenoid, ursolic acid, via activation of Wnt antagonist, sFRP4 and suppression of miRNA – 499a – 5p*. *Life Sci*. 2021; 265: 118854. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118854
52. Awasthi A, Hande MH, Rao P, Srinivas T, Hanumaiah G. *Association of Secreted Frizzled Related Protein 4 with Type 2 Diabetes Mellitus and its complications: A South Indian hospital based case control study*. *Clin Epidemiology Glob Health*. 2021; 9:171–174. doi:10.1016/j.cegh.2020.08.009
53. Tharmapalan P, Mahendrasingam M, Berman H K, Khokha R. *Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention*. *EMBO J*. 2019; 38(14):1–19. doi: 10.15252/embj.2018100852
54. Visweswaran M, Keane KN, Arfuso F, Dilley RJ, Newsholme P, Dharmarajan A. *The Influence of Breast Tumor – Derived Factors and Wnt Antagonism on the transformation of Adipose – Derived Mesenchymal Stem Cells Into Tumour – Associated Fibroblasts*. *Cancer Microenv*. 2018; 11(1):71–84. doi: 10.1007/s12307-018-0210-8
55. Deshmukh A, Arfuso F, Newsholme P, Dharmarajan A. *Regulation of Cancer Stem Cells Metabolism by Secreted Frizzled – Related Protein 4 (sFRP4)*. *Cancers*. 2018; 10(2):40. doi: 10.3390/cancers10020040
56. Mashhadikhan M, Kheiri H, Dehghanifard A. *DNA methylation and gene expression of sFRP2, sFRP4, Dkk1, and Wif1 during osteoblastic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells*. *J Oral Biosci*. 2020; 62(4):394–356. doi: 10.1016/j.job.2020.08.001
57. Li A, Schleicher SM, Andre F, Mitri ZI. *Genomic Alteration in Metastatic Breast Cancer and Its Treatment*. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2020; 40:1–14. doi: 10.1200/EDBK_280463
58. Testa V, Castelli G, Pelosi E. *Breast Cancer: A Molecularly Heterogeneous Disease Needing Subtype – Specific Treatment*. *Med Sci*. 2020; 8(1):18. doi: 10.3390/medsci8010018
59. Ayala de la Peña F, Andrés R, García-Sáenz JA, Manso L, Margelí M, et al. *SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer*. *Clin Transl Oncol*. 2018; 21(1):18–30. doi: 10.1007/s12094-018-1973-6

- 60.** Chacón López-Muñiz JI, de la Cruz Merino L, Gavilá Gregori J, et al. *SEOM clinical guidelines in advanced and recurrent breast cancer*. Clin Transl Oncol. 2018; 21(1):31–45. doi: 10.1007/s12094-018-02010-w
- 61.** Deshmukh A, Kumar S, Arfuso F, Newsholme P, Dharmarajan A. *Secreted Frizzled – Related Protein 4 (sFRP4) chemo – sensitizes cancer stem cells derived from human breast, prostate, and ovary human cell lines*. Sci Rep. 2017; 7(1):2256. doi: 10.1038/s41598-017-02256-4
- 62.** Cook D J, Kallus J, Jörnsten R, Nielsen J. *Molecular natural history of breast cancer: Leveraging transcriptomics to predict breast cancer progression and aggressiveness*. Cancer Med. 2020; 9(10):3551–3562. doi: 10.1002/cam4.2996
- 63.** Bhuvanlakshmi G, Basappa, Rangappa KS, et al. *Breast Cancer Stem – Like Cells Are Inhibited by Diosgenin, a Steroida Saponin, by the Attenuation of Wnt β – catenin Signaling via the Wnt Antagonist Secreted Frizzled Related Protein – 4*. Front Pharmacol. 2017; 8:124. doi: 10.3389/fphar.2017.00124

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.21804

Artículos de revisión

Avances en las formulaciones de los antisépticos

Advances in antiseptic formulations

Alberto Calle-Moriel¹  0000-0001-7855-823X

María Luisa González-Rodríguez¹  0000-0002-2450-1622

¹Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Sevilla, España.

Correspondencia

María Luisa González-Rodríguez
malugoro@us.es

Recibido: 19.07.2021

Aceptado: 09.09.2021

Publicado: 20.09.2021

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

The authors declare no conflict of interest.

Resumen

Objetivo: Revisar nuevas formulaciones antisépticas que minimicen los inconvenientes de las formulaciones convencionales y mejoren la efectividad los tratamientos actualmente usados.

Metodología: Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos científicas, como *Pubmed* o *Sciencedirect*, entre otras, así como en artículos de revistas científicas, libros, tesis doctorales y páginas webs oficiales siguiendo siempre criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. Una vez seleccionados los artículos de interés mediante palabras clave, se procedió a la organización de los contenidos de la revisión.

Resultados: Las formulaciones convencionales usadas en antisepsia presentan algunas limitaciones, como la formación de biopelículas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), la necesidad de conseguir un efecto más prolongado en el tiempo y la potenciación de la actividad microbiana debido a la resistencia a antisépticos, entre otros. Por este motivo, existen diversas líneas de investigación que intentan contrarrestar estas barreras mediante el diseño de nuevas formulaciones, como los sistemas de administración autoemulsionables de fármacos (SEDDS), sistemas formadores de película o usando la nanotecnología en forma de micelas cargadas con antisépticos, nanopartículas de organosilica mesoporosa o como nanopartículas de plata u ZnO que se combinan con polímeros como los hidrogeles o los poliuretanos para conseguir tratamientos más eficaces mejorando sus propiedades tanto antisépticas como mecánicas.

Conclusiones: Las diferentes estrategias que se abordan en esta revisión presentan mejores propiedades antisépticas que las terapias convencionales, según se recoge en los artículos revisados. Por este motivo, seguramente formarán parte de la amplia gama de antisépticos en un futuro próximo.

Palabras clave: Antisépticos; forma farmacéutica; nanopartículas; SEDDS; sistemas formadores de película.

Abstract

Objective: To review new antiseptic formulations that minimize the drawbacks of conventional formulations and improve the effectiveness of currently used treatments.

Methodology: A bibliographic search was carried out in different scientific databases, such as Pubmed or ScienceDirect, among others, as well as in articles of scientific journals, books, doctoral theses and official web pages, always following previously established inclusion and exclusion criteria. Once the articles of interest had been selected using keywords, the contents of the review were organized.

Results: The conventional formulations used in antiseptics have some limitations, such as the formation of biofilms by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the need to achieve a more prolonged effect over time and the potentiation of microbial activity due to resistance to antiseptics, among others. For this reason, there are several lines of research that attempt to counteract these barriers by designing new formulations such as self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS), film-forming systems or using nanotechnology in the form of antiseptic-loaded micelles, mesoporous organosilica nanoparticles or as silver or ZnO nanoparticles that are combined with polymers such as hydrogels or polyurethanes to achieve more effective treatments by improving both their antiseptic and mechanical properties.

Conclusions: The different strategies discussed in this review present better antiseptic properties than conventional therapies, as reported in the articles reviewed. For this reason, they will surely be part of the wide range of antiseptics in the near future.

Keywords: Antiseptics; pharmaceutical form; nanoparticles; SEDDS; film-forming systems.

Puntos clave

Los antisépticos son sustancias químicas ampliamente conocidas. Se encuentran detalladas y descritas sus diversas estructuras químicas, mecanismos de acción, vías de administración, formas farmacéuticas, indicaciones, contraindicaciones, reacciones adversas, posologías, recomendaciones, entre muchas otras características. A pesar de esto, existen algunos tratamientos que están dejando de ser eficaces por la aparición de resistencias. Este hecho ha fomentado el desarrollo de nuevas líneas de investigación que intenten potenciar la actividad antimicrobiana de los antisépticos, mediante el desarrollo de nuevas formulaciones que sean capaces de superar la ineficacia de las formulaciones convencionales en estos casos. Esta revisión recoge diferentes nuevas formulaciones en investigación que han demostrado ser más eficaces que los tratamientos convencionales, bien sea potenciando su actividad antiséptica o bien mediante otras técnicas como la prolongación de su efecto antiséptico, la mejora de la penetración de los fármacos, la adición de nuevos principios activos que complementen la acción antimicrobiana o aporten nuevos beneficios, entre otros. No cabe ninguna duda de que estas nuevas formulaciones entrarán en el mercado farmacéutico tanto a nivel hospitalario como a nivel de oficina comunitaria en un futuro muy cercano puesto que son capaces de alcanzar mejores perfiles antisépticos y combatir la resistencia antiséptica que está provocando que algunos tratamientos que actualmente estén siendo ineficaces.

Introducción

En el periodo transcurrido entre los siglos XV a XIX existía un desconocimiento general tanto de la antisepsia como de la asepsia. En un principio, para la curación de las heridas se utilizaban sábanas viejas, hilas, cordones y emplastos, entre otros materiales. Las condiciones insalubres de los hospitales, las abundantes infecciones, la escasa limpieza del material quirúrgico y de los cirujanos, los cuales no seguían protocolos para el lavado de manos y de la ropa, hacían del hospital un espacio en el que era muy fácil encontrarse con la muerte. Si a esto se le sumaba que la anestesia no era efectiva, muchos pacientes morían a causa del dolor o si no, de una infección⁽¹⁾.

En el siglo XVI, tras el sufrimiento de una guerra, el cirujano militar francés Ambrosio Paré (1510-1590) tuvo que emplear una pomada a base de aceite de rosas, trementina y yema de huevo debido a que no tenía material para cauterizar a sus soldados. Inesperadamente para él, los pacientes no presentaron inflamación, fiebre y sufrieron menos dolor, por lo que nunca más volvió a cauterizar a sus soldados⁽²⁾.

Algunos siglos más tarde, Ignacio Semmelweis (1818-1865) observó mediante un estudio, que los partos asistidos con médicos presentaban una menor frecuencia de muerte que con parteras, debido al cuidado del lavado de las manos que se estableció a los médicos como obligatorio⁽³⁾.

Años más tarde, en 1880, Charles Chamberland (1851-1908), junto con Louis Pasteur (1822-1895), desarrollaron el denominado “autoclave de Chamberland”, el primer sistema de esterilización médica creada a partir de una técnica desarrollada por Robert Koch (1843-1910)⁽¹⁾. Por la misma época, Joseph Lister (1827-1912), cirujano inglés, creó un método de desinfección que consistía en la aplicación de calor al material quirúrgico. Empezó, además, a utilizar el fenol tanto como antiséptico para desinfección de las manos de los cirujanos, como desinfectante del material quirúrgico y como bactericida para las heridas. Este uso se hizo habitual en los hospitales y junto con nuevas prácticas, como el uso de guantes durante cirugías, introducido por William Halsted (1852-1922), las muertes por infección disminuyeron drásticamente^(2,4).

Hoy día, el descubrimiento de nuevos antisépticos ha mejorado la lucha contra las infecciones. Poco a poco, la cirugía va progresando con el desarrollo de nuevas técnicas antisépticas o mejoras de las existentes. Sin embargo, las infecciones intrahospitalarias siguen siendo un problema de Salud Pública en los hospitales a nivel mundial.

Como es bien sabido, la clave de la infección es la “Cadena Epidemiológica”, y el eslabón más importante de ésta es el mecanismo de transmisión. Evitar la transmisión de un huésped a otro se consigue, con una correcta higiene de manos, desinfección, limpieza y esterilización. Todas estas prácticas for-

man parte de la rutina diaria de los sanitarios con el fin de mantener una asepsia y antisepsia adecuadas. No obstante, a pesar de todos los avances producidos, aún queda mucho por investigar y descubrir en este campo de la salud.

Los antisépticos son biocidas destinados a destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos sobre tejidos vivos como la piel, mucosas y heridas sin causar efecto lesivo sobre ellas^(5,6,7). Se diferencian de los desinfectantes en su concentración ya que los desinfectantes, al estar más concentrados, resultan ser más tóxicos sobre los tejidos vivos y, por ello, se utilizan sobre objetos y superficies inanimadas. Un mismo principio activo puede ser utilizado como antiséptico o desinfectante dependiendo de su concentración, ya que el mecanismo de acción no varía según la superficie en la que se aplique^(5,7).

Un buen antiséptico se caracteriza, en primer lugar, por ser inocuo a nivel local y a nivel sistémico. Además, debe presentar un amplio espectro de acción: bactericida, bacteriostático, viricida, esporicida o fungicida, entre otros. La duración de la actividad antiséptica debe ser suficiente, con un inicio de acción rápido y mantenimiento de esta durante un tiempo prolongado. Además, el antiséptico debe ser capaz de difundir sin dificultad a través de materia orgánica, como exudados, fibras y pus^(5,7).

La potencia de los antisépticos depende de diferentes factores. Así, la presencia de materia orgánica en la zona a tratar, como sangre o pus, puede dificultar la acción antiséptica. Como es lógico, el tiempo de actuación y la concentración afectan también a la actividad de estos compuestos y un incremento de la temperatura causa, en principio, un aumento de la acción antiséptica. Además, las formas no ionizadas de los compuestos que se disocian atraviesan mejor las membranas biológicas, por lo que resultan más efectivos. De ahí que, generalmente, los cationes son más activos a pH alcalino y los aniones a pH ácido⁽⁸⁾.

En general, se justifica el uso de los antisépticos en las siguientes circunstancias: disminución de la contaminación de la piel, lavado de manos en pacientes de alto riesgo, preparación de la piel para intervenciones, atención de pacientes con elevado riesgo de infecciones intrahospitalarias, uso tras el manejo de material contaminado, lavado quirúrgico de manos y preparación de la piel pre-intervención, entre otros⁽⁹⁾.

Atendiendo a su estructura y propiedades químicas, los antisépticos y desinfectantes se pueden clasificar en ácidos, alcoholes, aldehídos, oxidantes, halogenados, fenoles, biguanidas, tensioactivos, metales pesados, hexetidina y colorantes.

Con vistas a garantizar la seguridad del paciente y conseguir la máxima eficacia del producto, existen una serie de recomendaciones generales para el uso de antisépticos, entre las que destacan: evitar el uso combinado de antisépticos sin indicación previa de un profesional autorizado para ello, ya que se podrían potenciar los efectos adversos y en otras ocasiones, podría anularse su efecto⁽¹⁰⁾. Con el fin de evitar posibles contaminaciones, se recomienda la utilización de sistemas monodosis y envases pequeños⁽⁵⁾.

Respecto a las formas farmacéuticas más usadas en el mercado español, las soluciones no jabonosas representan el 83,6 % de las ventas totales. En ellas, los principios activos más usados son: povidona yodada (54,4 %), clorhexidina (39,4 %), agua oxigenada (2,2 %), mercurocromo (2,2 %) y alcohol (1,4 %)⁽¹¹⁾. Como no es el objetivo del trabajo recoger las características de cada uno de ellos, se exponen de forma muy resumida en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación, mecanismo de acción, espectro de actividad e indicaciones más comunes de los cinco anti-sépticos más usados en España en estos últimos años^(5,6,7,8,9,12,13,14).

| Antiséptico | Clasificación | Mecanismo de acción | Espectro de actividad | Indicaciones más comunes |
|-----------------|-----------------|--|--|--|
| Povidona yodada | Halogenados | Desnaturalización de las proteínas de las bacterias | Bactericida Esporicida Fungicida Viricida (sin envoltura lipídica) Activo frente a quistes y protozoos | Limpieza de instrumental y heridas, preparación de zona quirúrgica y lavado de manos |
| Clorhexidina | Biguanidas | Disminución en la permeabilidad de la membrana plasmática, provocando la pérdida de elementos constituyentes de la bacteria | Bactericida (G+ más sensibles) Fungistático y esporostático Actividad <i>in vitro</i> frente a ciertos virus | 0.05-5%: desinfección de la piel, enjuagues bucales y tratamiento de heridas o quemaduras |
| Agua oxigenada | Oxidantes | Oxidación de los grupos -SH de las enzimas bacterianas, liberando O ₂ en el medio | Bactericida Fungicida Viricida (algunos) Esporicida | 3-6%: amigdalitis, infecciones bucales, extracciones dentarias, antiséptico para limpieza de heridas |
| Mercurocromo | Metales pesados | Inhibición de determinadas enzimas bacterianas mediante la formación de sulfuros, interfiriendo así en el metabolismo bacteriano | Bacteriostática Fungistática | Desinfección de heridas superficiales y mucosas |
| Alcohol | Alcoholes | Desnaturalización de las proteínas de las bacterias | Bactericida (>70%) Fungicida y viricida variables | Preparación de inyección y material de curas. Limpieza de piel intacta |

Sin embargo, analizando 258 presentaciones de artículos comercializados y recogidos en la AEMPS, actualizada a 11 de marzo de 2020”, se puede observar representado en la Figura 1 que la mayoría de ellas corresponden a formas líquidas, mayoritariamente soluciones alcohólicas, aunque también se encuentran soluciones acuosas e hidroalcohólicas, de las cuales siempre se supera la concentración de alcohol del 70 %. A continuación, con un 16 % del total de las referencias se encuentran los geles hidroalcohólicos seguidos por los sprays. Por último, se encuentran los sprays y otras formas farmacéuticas como toallitas, cepillos/ esponjas, aplicadores, ampollas unidosis y espumas.

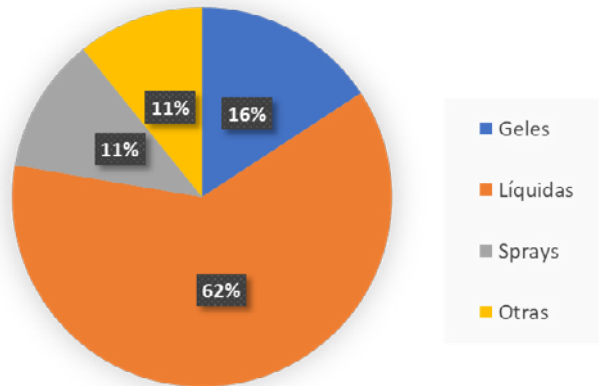


Figura 1. Formas farmacéuticas de antisépticos en España en el año 2020.

De las múltiples vías de administración, la vía tópica constituye la vía prioritaria de aplicación de los compuestos antisépticos, ya que el objetivo que se persigue con estas formulaciones es una acción local, minimizando su absorción. Por ello, es muy importante decidir cuáles son las formas farmacéuticas que mejor se adaptan a cada situación del paciente (geles, cremas, pomadas o ungüentos, entre otros). A pesar de toda esta variedad de formulaciones convencionales, existen limitaciones en su uso vía tópica, como la formación de biopelículas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), la necesidad de conseguir un efecto más prolongado con el tiempo, la potenciación de la actividad microbiana debido a la resistencia a antisépticos, entre otros. Esto puede parecer una novedad; sin embargo, se llevan describiendo casos desde hace varios siglos atrás y sigue estando vigente la aparición de nuevas cepas resistentes en la actualidad^(15,16,17,18,19). Ello conlleva la necesidad de seguir investigando nuevas formulaciones que intenten solventar algunas de estas limitaciones que presentan las formas convencionales.

Ya a nivel hospitalario se llevan a cabo una serie de medidas para la lucha contra las resistencias a antisépticos como, por ejemplo, el desarrollo de nuevos procedimientos para preparar y almacenar desinfectantes, la necesidad de rotación de biocidas en los hospitales y la reevaluación de los posibles efectos de los niveles residuales de biocidas como proceso selectivo de organismos resistentes⁽¹²⁾. Sin embargo, estos procedimientos no son suficientes.

La investigación y desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas antisépticas hoy en día se justifica porque la industria farmacéutica no está muy interesada en el desarrollo de nuevas moléculas con capacidad antimicrobiana, principalmente por motivos económicos debido a la baja rentabilidad de la inversión. Es por ello por lo que se centra en la mejora de las formulaciones y de las formas farmacéuticas, incrementando así la eficacia de los tratamientos ya existentes⁽²⁰⁾.

El objetivo del presente trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica sobre los avances que se han producido en la formulación de antisépticos aplicando nuevas tecnologías.

Métodos

Para el desarrollo de esta revisión, se ha realizado una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos científicas, como *Medline*, *Scopus*, *Sciencedirect* y *Google Scholar*, así como en artículos de revistas científicas, libros, tesis doctorales y páginas webs oficiales.

Criterios de inclusión: se han seleccionado textos exclusivamente en inglés o español, con libre accesibilidad al texto completo. También se han llevado a cabo criterios orientados al conocimiento farmacéutico y sobre todo desde el punto de vista de las formas farmacéuticas y sus formulaciones.

Criterios de exclusión: no se han tenido en cuenta estudios en distintos idiomas al inglés o al español y tampoco se ha obtenido información de fuentes de información no fiables.

La primera etapa de la búsqueda estuvo centrada en información general sobre los antisépticos. Para ello, se utilizó de palabra clave “antisépticos y desinfectantes” o “*antiseptics, disinfectants*” y se acotó al área de conocimiento farmacéutico y a estudios posteriores al año 2000. Una segunda búsqueda con palabras como “asepsia, antisepsia, historia” o “*asepsy, antisepsy, history*” llevó a encontrar la información para el contexto histórico.

Ese conjunto de estudios buscados abrió un gran abanico de posibilidades ya que, dentro de ellos, en sus correspondientes referencias se encontraban artículos más específicos que fueron de mucha ayuda para la comprensión y realización de esta revisión, concretamente, para la búsqueda de nuevas formas farmacéuticas. Esta fue la estrategia utilizada junto con el uso de palabras clave como “*antiseptic*” como principal y “*nanoparticles*”, “*mesoporous organosilica*”, “*micelles*”, “*SEDDS*” y “*hydrogels*” utilizando como operador “y/and” para relacionar los términos y/o combinarlos. Se acotó a los cinco últimos años y a artículos propios o revisiones para obtener estudios aún más recientes. Finalmente se han revisado un total de 56 referencias.

Resultados y discusión

Dada la problemática que existe con los antisépticos, se siguen buscando alternativas para mejorar los tratamientos y evitar la aparición de resistencias. Entre las múltiples opciones se encuentran los sistemas nanoparticulares y otros sistemas que se detallan a continuación. El uso de antisépticos y la variedad de productos que contienen biocidas han aumentado sustancialmente durante los últimos años, como es el caso de la clorhexidina en el sector odontológico⁽²¹⁾. No obstante, el uso indiscriminado de estos productos sin indicación alguna ha favorecido el desarrollo de resistencias y es por este motivo por lo que existen muchas líneas de investigación que desarrollan estrategias que potencien la actividad de estos fármacos. A continuación, en la **Tabla 2** se indican de forma resumida diferentes formulaciones de distintos principios activos según si son convencionales o novedosas que se encuentran en investigación.

Tabla 2. Formulaciones convencionales vs novedosas^(5,6,20,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39)

| Principio activo | Formulación convencional | Formulación avanzada |
|------------------|---|---|
| Clorhexidina | Soluciones | Sistemas formadores de película Nanopartículas de sílice mesoporosa Micelas poliméricas Sistemas autoemulsionables |
| ZnO | Polvos Pomadas Lociones Pastas Aerosol tópico | Nanopartículas de óxido de zinc |

| Principio activo | Formulación convencional | Formulación avanzada |
|---|--|--|
| Ag | (Sulfadiazina argéntica y nitrato de plata) Cremas Soluciones Barras cutáneas Colirios | Nanopartículas de plata |
| Aceites esenciales (árbol del té cinamaldehído y timol) | Cremas Geles corporales Jabones Pomadas Ungüentos Bálsamos | Poliuretanos conteniendo cinamaldehído Hidrogeles con nanoemulsiones o nanopartículas Emulgeles con nanoemulsiones |
| Povidona yodada | Jabones y desinfectantes de manos Soluciones Hidrogeles Ungüentos | |
| Triclosán | Parches adhesivos bucales Jabones Champús | Nanocápsulas Nanopartículas |

Micelas de copolímeros sensibles a enzimas

La mayoría de las infecciones de la piel están causadas por los agentes microbianos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Estas bacterias son capaces de formar biopelículas adhesivas y rígidas que son muy tolerantes a los efectos de los antimicrobianos debido a que la biopelícula actúa como barrera protectora física y química, retardando la penetración y reduciendo la efectividad de los antimicrobianos, provocando una disminución de la eficacia del tratamiento⁽⁴⁰⁾.

La clorhexidina, es un antiséptico utilizado habitualmente para prevenir y controlar, entre otros, a las MRSA. Debido al desarrollo de resistencias, es necesario establecer mejoras en el tratamiento de este fármaco contra las biopelículas. En este campo, el uso de los sistemas nanotransportadores basados en nanopartículas ofrecen ventajas frente a los preparados convencionales ya que, con su composición y debido a su reducido tamaño, son capaces de atacar, destruir y también manipular las características fisiológicas de las bacterias, presentando mejor biocompatibilidad y eficacia frente a otros tratamientos^(41,42). Además, estas nanopartículas serían capaces de mantener una liberación controlada del fármaco frente a un entorno patológico, pudiendo llegar a reducir la dosis necesaria para conseguir el éxito terapéutico⁽⁴³⁾.

El uso de formulaciones convencionales lleva, en muchas ocasiones, al fracaso terapéutico debido a que estas bacterias son capaces de sintetizar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como proteínas, ADN extracelular, polisacáridos o enzimas que actúan de barrera fisicoquímica y afectan a la penetración del antiséptico ya sea mediante interacciones electrostáticas, hidrofílicas o enzimáticas⁽²⁴⁾.

Para solventar estos problemas, se han diseñado micelas poliméricas para su aplicación tópica. Las micelas poliméricas, como se muestra en la **Figura 2**, son estructuras formadas mediante auto-ensamblado espontáneo tras superar la concentración micelar crítica (CMC) de moléculas poliméricas anfifílicas, pudiendo alcanzar tamaños nanométricos. La parte hidrofóbica se asocia para formar una zona interna denominada núcleo micelar que es capaz de solubilizar fármacos liposolubles, mientras que la parte hidrofílica se localiza en contacto directo con el medio, comúnmente acuoso⁽⁴⁴⁾.

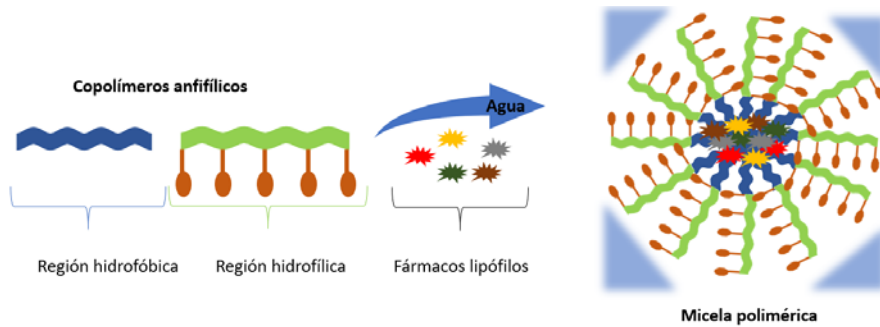


Figura 2. Formación de micelas poliméricas.

En este estudio seleccionado, las micelas contenían en su formulación polímeros que son sensibles a la acción enzimática de estas especies bacterianas: policaprolactona (PCL), acetato de polivinilo (PVA) y polietilenglicol 6000 (PEG) que conjuntamente se encuentran comercializados como Soluplus® (Sol). Con este copolímero se han desarrollado micelas poliméricas capaces de vehiculizar principios activos con bajas propiedades de solubilidad⁽⁴⁵⁾. Además, Sol se ha mezclado con Solutol® HS 15 (ST) para formar micelas mixtas capaces de mejorar también la solubilidad de algunos fármacos⁽⁴⁶⁾. ST está formado por 15-hidroxiestearato de macrogol y es utilizado como agente emulsionante y solubilizante no iónico.

Se ha demostrado la actividad antibiopelícula de Sol y sus efectos contra *S. epidermidis*, que están justificados en base a la presencia en el polímero de un anillo de caprolactama, susceptible de ser degradado por lipasas/esterasas, las cuales se encuentran en esta serie de patógenos. Dicha degradación mediada por enzimas permite una liberación sostenida de clorhexidina en el interior de la biopelícula⁽⁴⁷⁾. Las micelas se prepararon según^(24,48,49).

Según el estudio de capacidad antibacteriana, se observaron diferencias significativas entre la concentración de biomasa de la biopelícula cuando se utilizó el fármaco y cuando se aplicó en forma de micelas poliméricas. Además, se comprobó que la reformulación de la clorhexidina a micelas poliméricas mejoró la penetración en las biopelículas debido a la presencia de las cadenas de polietilenglicol, capaces de evitar la unión del fármaco a las biopelículas.

Por último, se observó que era ventajoso formular el fármaco como tal a su sal digluconato ya que, aunque es menos soluble en agua, sin embargo, la carga de clorhexidina como catión, retardaba la penetración⁽²⁴⁾.

Se concluye que este tipo de formulaciones consigue reducir la resistencia bacteriana por una mejora de la penetración del fármaco en el sitio activo y un aumento del tiempo de la liberación del mismo.

Nanopartículas biodegradables de organosílice mesoporosa

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) han ganado terreno en el campo de la biomedicina y la administración de fármacos y biodetección, entre otros⁽⁵⁰⁾. Este tipo de nanopartículas están constituidas por una matriz de sílice compuesta por mesoporos ordenados periódicamente en diversas estructuras, como la que se indica en la **Figura 3**. Estos sistemas presentan tamaños de poro comprendidos entre 2 y 30 nm. Además, las estructuras son moldeables y presentan una elevada densidad de grupos silanol (Si-OH) en su superficie, la cual les confiere la capacidad de modificar fácilmente sus propiedades⁽⁵¹⁾.

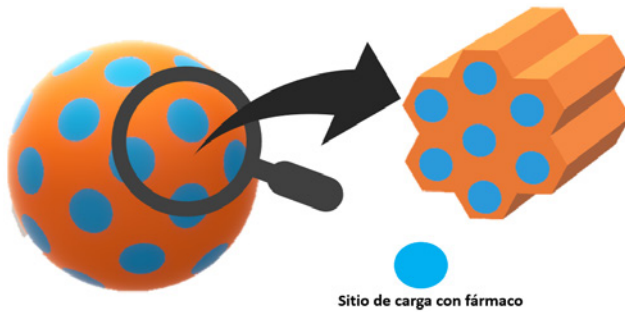


Figura 3. Estructura química de las nanopartículas de sílice mesoporosa.

Las MSNs presentan una serie de ventajas sobre otros portadores inorgánicos como: gran área superficial, tamaño de poro ajustable, fácil modificación de la superficie y biocompatibilidad⁽²³⁾. Se obtienen por un método sol-gel⁽⁵²⁾ mediante síntesis en una sola etapa, y con la utilización de agentes inertes estructurales que forman los mesoporos, haciéndolos adecuados para cargar principios activos y modificables superficialmente⁽⁵³⁾.

Estos transportadores inorgánicos, en muchas ocasiones, requieren funcionalizaciones de naturaleza orgánica, las cuales le aportan mejores características en el entorno biológico, capacidad de carga, entre otros, convirtiéndolos así en materiales híbridos⁽⁵¹⁾. De esta necesidad surgen las nanopartículas de organosílice mesoporosa (MONs). Stewart et al. (2018), con el fin de mejorar la funcionalidad de los MSN para aportar biofunciones propias, utilizaron como estructuras base para formar los mesoporos, moléculas tensoactivas catiónicas con actividades antimicrobianas, poseyendo así una doble función: estructural, como plantilla, y funcional, como antimicrobiano⁽⁵³⁾. Esto permite una elevada capacidad de carga de fármaco y una liberación sostenida mejorada, comparada con las MSNs convencionales. Existen diversos estudios que han encapsulado clorhexidina en MSNs con el fin de proporcionar una liberación prolongada del principio activo con propiedades antimicrobianas^(55,56). En la **Figura 4** se recoge un esquema de síntesis de MONs así como su efecto antibacteriano.

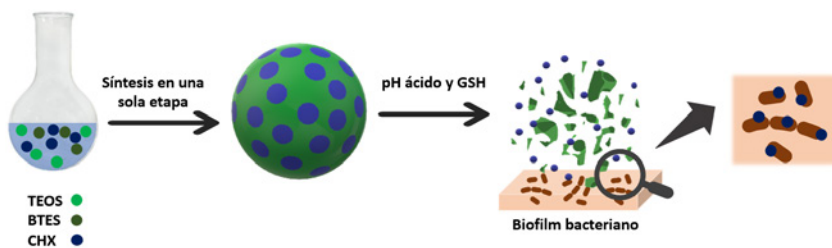


Figura 4. Representación esquemática de la síntesis en una sola etapa y acción antibacteriana de MONs de clorhexidina biodegradables, liberación y efecto antibacteriano. TEOS: Tetraetil ortosilicato, BTES: bis[3-(trietoxisilil)propil]tetrasulfuro y CHX: clorhexidina.

La lenta e incontrolada degradación de los MSNs impide su uso en clínica, pero, en este caso, estas MONs están compuestas por enlaces disulfuro sensible a glutatión, lo cual permite una eficiente y segura actividad antibacteriana, mejorando sus perfiles de liberación con respecto al tiempo⁽⁵⁷⁾. El estudio de liberación muestra cómo un aumento en la concentración de glutatión proporciona una liberación de mayor contenido que los que presentan menor concentración.

En conclusión, al igual que las micelas, consiguen reducir la resistencia bacteriana por una mejora de la penetración del fármaco en el sitio activo y un aumento del tiempo de la liberación del mismo.

Sistemas autoemulsionables

Otras líneas de investigación exploran la adición de agentes que potencien y actúen sinérgicamente con los antisépticos para mejorar su eficacia antimicrobiana⁽⁵⁸⁾. Entre ellos se encuentra la adición de EDTA a clorhexidina. Como es bien conocido, EDTA es un agente quelante que posee una elevada afinidad por los iones metálicos. Esta característica le permite unirse a iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} , secuestrándolos e inhibiendo el crecimiento de los microorganismos⁽⁵⁹⁾. Dicha captación causaría así una desestabilización de las membranas que podría mejorar la penetración de la clorhexidina cuando se emplearan conjuntamente⁽⁶⁰⁾. El problema de formular ambos compuestos en una misma formulación radica en que clorhexidina y EDTA son incompatibles en medios acuosos, ya que forman complejos insolubles, por tanto, inactivos⁽⁶¹⁾. Se plantea como posible solución el empleo de los denominados sistemas autoemulsionables de liberación de fármacos (SEDDS). Estos sistemas son mezclas isotrópicas de lípidos o aceites, disolventes y tensioactivos que forman una emulsión espontáneamente tras el contacto con fluidos corporales⁽⁶²⁾. En la **Figura 5** se indica de forma esquemática cómo ocurriría este proceso de formación de SEDDS.

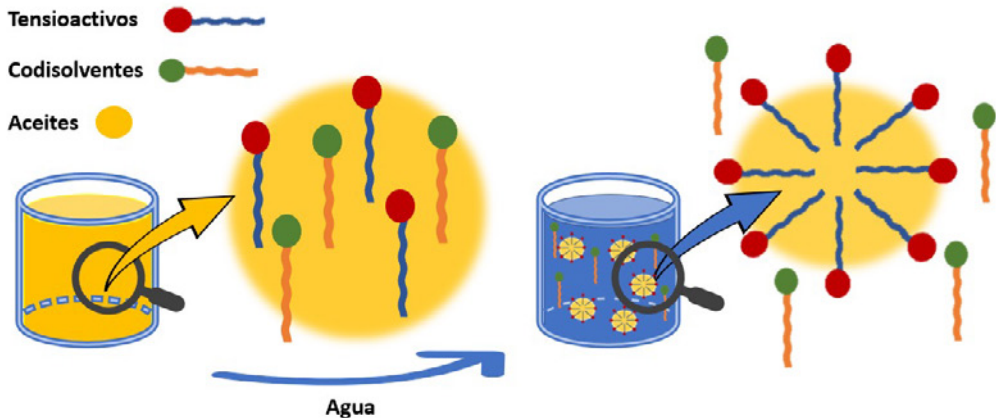


Figura 5. Representación esquemática de la formación de SEDDS.

Dentro de estos sistemas, la clorhexidina permanecería en su forma no ionizada, presentando así una mejor penetración. Asimismo, habría que utilizar alquil-EDTA por ser más hidrofóbico que EDTA. Los resultados con estas modificaciones en la formulación demostraron que los SEDDS que contenían alquil-EDTA y clorhexidina con la sal digluconato presentaron una mayor actividad antimicrobiana durante un periodo de 8 h frente a una formulación convencional con clorhexidina. Se compararon las capacidades inhibitoras de los SEDDS solo con alquil-EDTA, solo con clorhexidina y con ambos, en diferentes diluciones y se observó que la concentración menos diluida y la que presentaba la combinación de ambos compuestos apenas presentó crecimiento bacteriano⁽²⁰⁾.

Por tanto, acorde con estos resultados, la combinación de alquil-EDTA junto con antisépticos en SEDDS pueden, en un futuro cercano, constituir una estrategia interesante para combatir las resistencias bacterianas pues consiguen disminuir las resistencias bacterianas mediante la liberación sostenida de principio activo y, por consiguiente, una menor posología y uso del mismo.

Sistemas formadores de película

Como es bien sabido, la piel constituye una interesante vía de administración de fármacos. Las formas farmacéuticas clásicas de administración cutánea presentan ciertas desventajas, como es la baja permeabilidad del principio activo en muchos casos, la necesidad de varias dosificaciones al día, irritación de la piel, baja adhesividad a la piel y escaso cumplimiento por parte del paciente, entre otras^(63,64).

Con el fin de mejorar estas limitaciones, se han desarrollado los denominados sistemas formadores de película. Se trata de formas de dosificación “*in situ*” que se adhieren a la piel formando una película delgada y transparente que es capaz de facilitar el contacto del principio activo con el tejido cutáneo tras la evaporación del disolvente. La película formada puede ser sólida, constituida por materiales poliméricos que actúan como matriz liberando el fármaco de manera prolongada, o bien líquida, liberándose rápidamente. En la **Figura 6** se observa este mecanismo de formación del film.

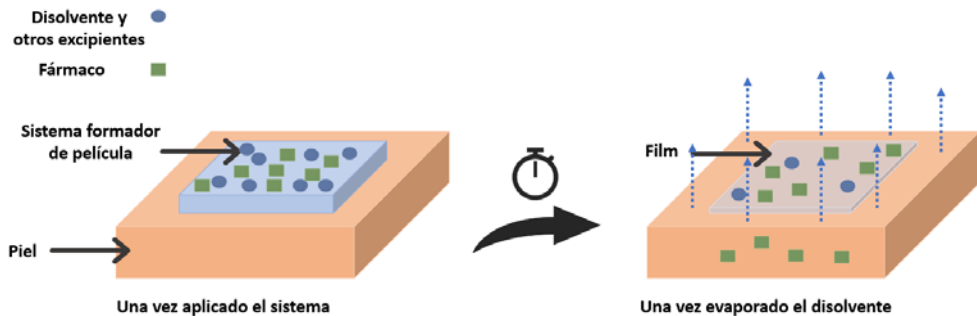


Figura 6. Mecanismo de formación de película antiséptica.

Gracias a este mecanismo, se consigue aumentar mucho la concentración del fármaco, permitiendo alcanzar el nivel de sobresaturación en la superficie de la piel. Esta sobresaturación mejora el flujo del principio activo sobre la piel, sin dañarla, reduciendo así los efectos secundarios, como la irritación⁽²²⁾.

Entre otras aplicaciones, cabe destacar la cirugía o el cuidado de las heridas. Así, pueden contener agentes antimicrobianos para prevenir sus infecciones⁽⁶⁵⁾. Las películas no son pegajosas, son flexibles y se despegan con facilidad si se desea y, debido a su alta adhesión a la piel, se reducen el riesgo de transferir las moléculas activas a otras personas a la ropa u otros materiales.

Estas formulaciones se encuentran disponibles como sprays, soluciones, emulsiones o geles. Los componentes que suelen contener estas formulaciones son:

- **Fármaco:** peso molecular inferior a 500 dalton, coeficiente de reparto ideal comprendido entre 1 y 3 y preferiblemente, no irritante ni sensibilizante.
- **Polímeros:** es la base de la formulación y se usan de forma individual o conjunta para lograr las propiedades deseadas, como flexibilidad o transparencia, entre otras.
- **Disolventes:** presentan diferentes funciones, como ayudar a solubilizar al fármaco, mantener la humectación (ej. propilenglicol o polietilenglicol), formación de la película por evaporación (ej. etanol, butanol o isopropanol) o mejorar la penetración del principio activo (ej. ácido oleico o miristato de isopropilo).
- **Plastificantes:** deben ser miscibles con el polímero y, además, mejoran las propiedades de la película, como la resistencia a la tracción o la flexibilidad (ej. propilenglicol, sorbitol o glicerina).

Además de estos excipientes, dependiendo de la formulación, puede ser conveniente añadir otros. Así, cuando se utiliza Eudragit E® 100, es necesario añadir ácido succínico como reticulante para mejorar la estabilidad del film. También pueden añadirse antioxidantes, si el principio activo es sensible a la

oxidación; colorantes, si se necesita ver por algún motivo el film o añadirle protección solar si fuese necesario⁽⁶⁵⁾.

Estas formulaciones podrían abrir un nuevo campo en el desarrollo de antisépticos más eficaces, a pesar de que ya existen algunos productos comercializados, ninguno contiene antisépticos como principio activo; por este motivo, aún requieren un mayor desarrollo a nivel industrial. Estos sistemas son capaces de concentrar el fármaco más que con otras formulaciones convencionales, permitiendo así una mayor eficacia de los tratamientos actuales.

Hidrogeles nanoestructurados

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de cicatrización de heridas es un proceso complejo y continuo que está destinado a reconstruir las células y el epitelio dañado. A pesar de que hoy en día los apósitos tradicionales como las gasas estériles o el algodón son los más vendidos, el uso de nuevos apósitos con mejores propiedades, como la protección frente a microorganismos, la absorción de fluidos, la adición de factores de crecimiento, entre otros, están siendo más demandados⁽⁶⁶⁾.

En la formulación de estos apósitos, están adquiriendo especial relevancia los hidrogeles. Estas estructuras tridimensionales de polímeros hidrófilos son usadas en diversos campos de la salud, como las lentes de contacto o la liberación controlada de fármacos. Estos sistemas tienen una elevada proporción de agua absorbida y proporcionan un microclima húmedo que evita la deshidratación de las heridas. Además, su elevada biocompatibilidad le permite estar en contacto con fluidos y tejidos corporales⁽²⁵⁾.

Khorasani et al. (2018) plantearon la combinación de polímeros (PVA y quitosano) cargados con compuestos biológicos, como la heparina, y con compuestos inorgánicos, como el ZnO, en tamaño nanométrico, para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas como la resistencia mecánica o térmica, mejor control de la liberación, etc.

La quitina es un polímero natural que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos. En el ámbito sanitario presenta múltiples utilidades por sus funciones como antimicrobiano, cicatrizante, analgesia, baja inmunogenicidad y toxicidad, entre otros⁽⁶⁷⁾. La desacetilación parcial de la quitina da lugar al quitosano. Este polímero está formado por la unión covalente entre las cadenas de quitosano de mayor peso molecular y PVA, degradándose el quitosano de menor peso⁽⁶⁸⁾.

El ZnO presenta actividad antibacteriana, y favorece el crecimiento de la cicatrización debido a la liberación de iones Zn en la superficie de la herida^(69,70). Además, presenta otras ventajas, como su bajo coste o su baja toxicidad. Otros estudios afirman que el uso de ZnO en tamaños nanométricos aumentan su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*. La heparina posee actividad anticoagulante y antiinflamatoria. También favorece la biocompatibilidad del apósito y su actividad revitalizante.

En este estudio se demostró que el control de liberación de la heparina resultó de gran importancia, ya que este glicosaminoglucano induce una recuperación más rápida de la herida por la mejora de la angiogénesis. Los resultados obtenidos arrojaron que las muestras que presentaban una mayor concentración de ZnO causaron una disminución de la liberación de heparina en las primeras horas. Sin embargo, a las 72 horas, todas las muestras consiguieron liberar la misma cantidad de heparina, alcanzando 9 µg/cm².

Respecto a las propiedades antibacterianas, se evaluaron respecto a *E. coli* y *S. aureus* por el método de Kirby-Bauer. Dado que las propiedades del quitosano y ZnO son antibacterianas, se observó un mayor poder inhibitorio en las muestras que contenían ambos compuestos. Por último, también se observó mayor zona de inhibición en los compuestos que presentaban mayor concentración de ZnO.

En conclusión, los hidrogeles con PVA, quitosano, heparina y ZnO presentaban mejores propiedades que los tratamientos actuales de apósitos convencionales, pues protegen a la herida de la deshidratación y de acumulación de exudados, y son capaces de evitar el crecimiento de bacterias y acelerar el proceso de cicatrización de la piel. Estos tratamientos pueden contribuir a la disminución de resistencias antisépticas pues combinan diferentes estrategias para la cicatrización y cura efectiva de heridas evitando así el uso prolongado en el tiempo de antisépticos.

Scaffolds con hidrogel de quitina y nanopartículas de plata

Los denominados *scaffolds*, o estructuras soporte, aportan un “esqueleto” que debe ser capaz de ser invadido por células para favorecer la regeneración tisular junto con factores de crecimiento u otras moléculas. Este tipo de formulaciones constituyen nuevas técnicas de ingeniería tisular cuyo objetivo principal es favorecer la regeneración de los tejidos⁽⁷¹⁾. Un *scaffold* debe ser biocompatible, biodegradable, de fácil fabricación y debe proporcionar el apoyo mecánico para estimular la reparación y la proliferación celular^(72,73).

En un estudio propuesto por Nagalakshmi et al (2020) se plantea la posibilidad de utilizar estas estructuras formadas con un hidrogel de quitina y nanopartículas de plata, como agente antiséptico, para utilizarse en apósitos y promover la cicatrización con el fin de proteger a la herida de una posible contaminación y sufrir más daño.

En este estudio, los *scaffolds* se prepararon mezclando una solución de nanopartículas de plata con un hidrogel de quitina a 5 diferentes concentraciones y liofilizando durante 2 días. Todas estas formulaciones se caracterizaron midiendo propiedades, como la porosidad, capacidad de hinchamiento, estudios de liberación y actividad antimicrobiana, entre otras⁽²⁶⁾. En la **Figura 7** se representa el procedimiento de formación del *scaffold* para este estudio.

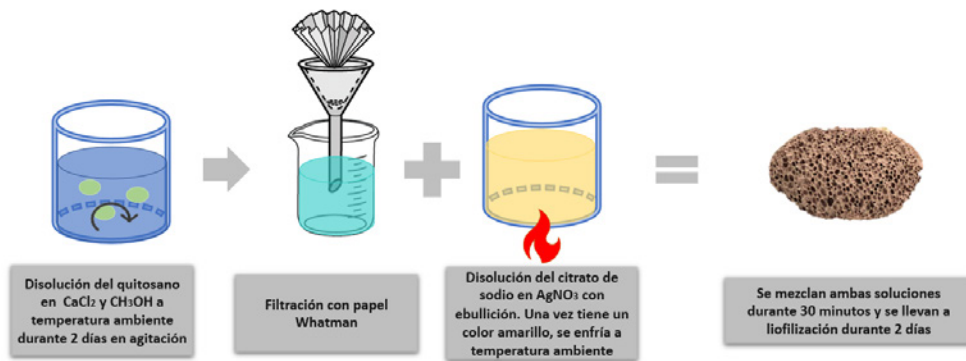


Figura 7. Procedimiento de formación del *scaffold* que se desarrolla.

Los resultados fueron bastantes prometedores. En lo que a su perfil de liberación respecta, todas las formulaciones liberaron el 100% de su contenido entre las 5 y 8 h, siendo la formulación con mayor cantidad de quitina la que más tiempo tardó en liberar su contenido, presentando así buenos perfiles de liberación prolongada. La actividad antibacteriana se determinó *in vitro* mediante el método de Kirby-Bauer. Se observó que la zona de inhibición era más grande frente a microorganismos como *S. typhi* que frente a *S. aureus*, evidenciándose así que presenta un espectro de actividad más activo frente a gram-negativos.

Estos estudios sugieren una nueva alternativa para el tratamiento de heridas con apósitos. Aun así, son necesarios estudios de citotoxicidad *in vitro* y modelos experimentales *in vivo* con animales.

Poliuretanos

Otra de las herramientas que se pueden utilizar para la curación de las heridas es la utilización de poliuretanos. Estos compuestos son polímeros tridimensionales formados por diisocianatos, macroglicoles y extensores de la cadena (dioles o aminas generalmente). Depende de cómo se distribuyan en la red polimérica, se pueden presentar varias configuraciones. Como se observa en la **Figura 8**, en la estructura química y polimérica general de los poliuretanos existen “segmentos blandos” (correspon-

dientes a las cadenas de poliéster del macroglícol) y “segmentos duros” (corresponde al isocianato y al extensor de cadena). Esto permite que se puedan variar sus propiedades permitiendo conseguir una biocompatibilidad elevada, no ser tóxicos y unas propiedades mecánicas adecuadas⁽⁷⁴⁾. A diferencia de los hidrogeles, estos permiten controlar mejor su proceso de degradación. Es por este motivo por el que los poliuretanos se están estudiando. Actualmente ya existen poliuretanos comercializados en forma de apósitos llamados Tegaderm o Bioclusive; no obstante, a pesar de ello, pueden mejorar bastante sus propiedades⁽⁷⁵⁾.

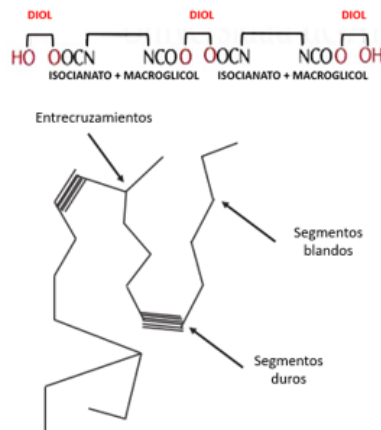


Figura 8. Representación estructural química y polimérica de los poliuretanos.

Los poliuretanos pueden formar *scaffolds* de estructura porosa, la cual ha demostrado tener buenas propiedades para la regeneración de la dermis. Kucinska-Lipka et al (2018) utilizan POLIOS 55/20 (α,ω -dihidroxi(etilen-butilen adipato), HMDI (Bis(4-isocianatociclohexil)metano), BDO (1,4 Butanodiol) para formular sus poliuretanos y añaden cinamaldehído, el compuesto aldehído natural aromático principal del aceite de *Cinnamomum zeylanicum* (árbol de la canela o cinamomo), que presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias, las cuales resultan muy útiles para su uso en apósitos. El grupo aldehído le permite unirse a los polímeros como los poliuretanos, quitosano, entre otros. El mecanismo de acción depende de su concentración, de forma que a bajas concentraciones inhibe a las citocinas, mientras que a concentraciones más altas inhibe a la ATPasa alterando la membrana celular⁽²⁷⁾. Se determinó que la adición de cinamaldehído a los poliuretanos en *scaffolds* microporosos en concentraciones de 3,5% presentó actividad antibacteriana efectiva contra especies como *E. coli* o *S. aureus*. A pesar de que la actividad antibacteriana es baja, debido a que el cinamaldehído es poco soluble en agua, se plantea la hipótesis de que, en un medio húmedo como el ambiente de una herida, puede presentar mejores velocidades de difusión y, por consiguiente, una mejor actividad antiséptica, influyendo así en la disminución de resistencias a antisépticos.

Además, existen otras líneas de investigación que trabajan con otro compuesto natural, el própolis, el cual se ha observado que interfiere en la actividad antimicrobiana de algunos antisépticos, aumentándola en el caso de administrarse junto a dihidrocloruro de octenidina (tensioactivo catiónico) o 2-fenoxietanol y disminuyéndola en el caso de la clorhexidina. Estos estudios se encuentran en fase de desarrollo con previsiones a futuras optimizaciones para su uso en la clínica⁽⁷⁶⁾.

Conclusiones

Existe un amplio abanico de líneas de investigación que intentan solventar las limitaciones de las formulaciones convencionales antisépticas y aunque aquí se abordan de forma individualizada, existen estudios que combinan estos sistemas entre sí. Se observa que estas combinaciones se utilizan, como se han mencionado durante la revisión, para alcanzar mejores perfiles antisépticos o propiedades mecánicas y no hay ninguna duda de que dentro de muy poco tiempo formarán parte de nuevos productos que se encontrarán disponibles en farmacias u hospitales a manos del profesional sanitario.

Bibliografía

1. Araujo-Rodríguez FJ, Encinas-Barrios C, Araujo-O`Reilly FJ, Torres MA. Asepsia y Antiseptia. Visión histórica desde un cuadro. 2011; 2:61-64.
2. Jácome-Roca A. Historia de los medicamentos. 2ª ed. Colombia: EAE; 2008.
3. Daniels IR. Historical perspectives on health. Semmelweis: a lesson to relearn? J R Soc Promot Health. 1998; 118(6):367-370. doi: 10.1177/146642409811800617.
4. Fu Kuo-Tai L. Great names in the history of orthopaedics XIV: Joseph Lister (1827-1912) Part 1. J Orthop Trauma Rehabil. 2010; 14:30-38. <https://doi.org/10.1016/j.jotr.2010.08.004>
5. Benedí J. Antisépticos. Farm Prof. 2005; 19(8):58-61.
6. Arévalo JM, Arribas JL, Hernández MJ, Herruzo ML. Guía de utilización de antisépticos. MPR. 2000:1-11.
7. Bilbao N. Antisépticos y desinfectantes. Farm Prof. 2009; 23(4):37-39.
8. González L. Antisépticos y desinfectantes. Offarm. 2003; 22(3):64-70.
9. Pontificia Universidad Católica de Chile. Escuela de Enfermería. Manejo de Heridas. Antisépticos y desinfectantes [en línea]. [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <http://www6.uc.cl/manejoheridas/html/antiseptico.html>
10. Del Río-Carbajo L, Vidal-Cortés P. Tipos de antisépticos, presentaciones y normas de uso. Med Intensiva. 2019; 43:7-12. DOI: 10.1016/j.medin.2018.09.013.
11. Divins M. Información de Mercado, Antisépticos. Farm Prof. 2017; 31(5):6-9.
12. Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao MI, Medel M, et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Rev Chil Infectología. 2017; 34:156-174. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>.
13. López-González L, Gutiérrez-Pérez MI, Lucio-Villegas-Menéndez ME, Aresté-Lluch N, Morató Agustí ML, Cachafeiro-Pérez S. Introducción a los antisépticos. Aten Prim. 2014; 46:1-9.
14. Font E. Antisépticos y desinfectantes. Offarm. 2001; 20(2):55-63.
15. Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. J Hosp Infect. 2004; 57:97-104. DOI: 10.1016/j.jhin.2004.01.004
16. Nakahara H, Kozukue H. Isolation of chlorhexidine-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from clinical lesions. J Clin Microbiol 1982; 15:166-168. Doi:10.1128/jcm.15.1.166-168.1982
17. Martin DJ, Denyer SP, McDonnell G, Maillard JY. Resistance and cross-resistance to oxidizing agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. J Hosp Infect. 2008; 69:377-383. doi: 10.1016/j.jhin.2008.04.010.
18. Vigeant P, Loo VG, Bertran C, Dixon C, Hollis M, Pfaller A, et al. An outbreak of *Serratia marcescens* infections related to contaminated chlorhexidine. Infect Control Hosp Epidemiol. 1998; 19:791-794. doi: 10.1086/647728.

19. Lee AS, Macedo-Vinas M, Francois P, et al. Impact of combined low-level mupirocin and genotypic chlorhexidine resistance on persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage after decolonization therapy: a case et control study. *Clin Infect Dis*. 2011; 52:1422-1430. doi: 10.1093/cid/cir233.
20. Jalil A, Asim MH, Akkus ZB, Schoenthaler M, Matuszczak B, Bernkop-Schnürch A. Self-emulsifying drug delivery systems comprising chlorhexidine and alkyl-EDTA: A novel approach for augmented antimicrobial activity. *J Mol Liq*. 2019; 295:1-8. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111649
21. Harbarth S, Tuan Soh S, Horner C, Wilcox MH. Is reduced susceptibility to disinfectants and antiseptics a risk in healthcare settings? A point/counterpoint review. *J Hosp Infect*. 2014; 87:194-202.
22. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2017; 12:487-497. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>
23. He Y, Zhang Y, Sun M, Yang C, Zheng X, Shi C, et al. One-pot synthesis of chlorhexidine-templated biodegradable mesoporous organosilica nanoantiseptics. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2020; 187:1-7. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110653
24. Albayaty YN, Thomas N, Hasan S, Prestidge CA. Penetration of topically used antimicrobials through *Staphylococcus aureus* biofilms: a comparative study using different models. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018; 48:429-436. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.10.015
25. Khorasani MT, Joorabloo A, Moghaddam A, Shamsi H, MansooriMoghadam Z. Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application. *Int J Biol Macromol*. 2018; 114:1203-1215. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.010.
26. Nagalakshmi S, Bhavishi G, Anusha M, Asha M, Gani A, Shanmuganathan S. Fabrication and Characterization of Chitin Hydrogel Nano Silver Fused Scaffold for Wound Dressing Applications. *IJPER*. 2020; 54(3): 610-617. DOI: 10.5530/ijper.54.3.110
27. Kucinska-Lipka J, Gubanska I, Lewandowska A, Terebieniec A, Przybytek A, Cieślinski H. Antibacterial polyurethanes, modified with cinnamaldehyde, as potential materials for fabrication of wound dressings, *Polym Bull*. 2018; 76(6): 2725-2742. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2512-x>
28. Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CMB, Beck RCR, et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of trichophyton rubrum. *Mycopathologia*. 2013; 175:281-286. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9622-7>
29. Flores FC, De Lima JA, Da Silva CR, Benvegno D, Ferreira J, Burger ME, et al. Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil provide antiedematogenic effect and improved skin wound healing. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015; 15:800-809. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9176>
30. Chiriac AP, Rusu AG, Nita LE, Macsim AM, Tudorachi N, Rosca I, et al. Synthesis of Poly(Ethylene Brassylate-Co-squaric Acid) as Potential Essential Oil Carrier. *Pharmaceutics*. 2021; 13:453-477. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040477>
31. Hamedi H, Moradi S, Tonelli AE, Hudson SM. Preparation and characterization of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes loaded with antibacterial thyme oil nanoemulsions. *Appl Sciences*. 2019; 9(18):3933. <https://doi.org/10.3390/app9183933>
32. Sinha P, Srivastava S, Mishra N, Singh DK, Luqman S, Chanda D, et al. Development, optimization, and characterization of a novel tea tree oil nanogel using response surface methodology. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016; 42:1434-1445. <https://doi.org/10.3109/03639045.2016.1141931>
33. De Marchi JGB, Jornada DS, Silva FK, Freitas AL, Fuentefria AM, Pohlmann AR, et al. Triclosan resistance reversion by encapsulation in chitosan-coated-nanocapsule containing α -bisabolol as core: Development of wound dressing. *Int J Nanomed*. 2017; 12:7855-7868. doi: 10.2147/IJN.S143324
34. Davachi SM, Kaffashi B. Preparation and Characterization of Poly L-Lactide/Triclosan Nanoparticles for Specific Antibacterial and Medical Applications. *Int J Polym Mater*. 2015; 6:497-508. <https://doi.org/10.1080/00914037.2014.977897>

35. Wais U, Nawrath MM, Jackson AW, Zhang H. Triclosan nanoparticles via emulsion-freeze-drying for enhanced antimicrobial activity. *Colloid Polym Sci.* 2018; 296:951-960. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4312-0>
36. Domínguez-Delgado CL, Rodríguez-Cruz IM, Escobar-Chávez JJ, Calderón-Lojero IO, Quintana-Guerrero D, Ganem, A. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles intended to be used for the treatment of acne. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 79:102-107. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.017>
37. Hoang TPN, Ghori MU, Conway BR. Topical Antiseptic Formulations for Skin and Soft Tissue Infections. *Pharmaceutics.* 2021; 13:527-558. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040558>
38. López-González L, Gutiérrez-Pérez MI, Lucio-Villegas-Menéndez ME, Aresté-Lluch N, Morató, Agustí ML, Cachafeiro-Pérez S. Introducción a los antisépticos. *Aten Prim.* 2014; 46:1-9. DOI: 10.1016/S0212-6567(14)70055-1
39. Verzi AE, Nasca MR, Dall'Oglio F, Cosentino C, Micali G. A novel treatment of intertrigo in athletes and overweight subjects. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(1):23-27. doi:10.1111/jocd.14097
40. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. *Biofilms* bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra.* 2005; 28(2):163-175.
41. Miller KP, Wang L, Benicewicz BC, Decho AW. Inorganic nanoparticles engineered to attack bacteria. *Chem Soc Rev.* 2015; 44:7787-7807. <https://doi.org/10.1039/C5CS00041F>
42. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles, *Trends Biotechnol.* 2012; 30 :499-511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
43. Chang ZM, Wang Z, Lu MM, Shao D, Yue J, Yang D, et al. Janus silver mesoporous silica nanobullets with synergistic antibacterial functions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017; 157:199-206. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.079>
44. Álvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Sosnik A. Micelas poliméricas para encapsulación, vectorización y cesión de fármacos. En: Álvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Sosnik A, editores. *Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados.* Coimbra: Pombalina University press; 2020. p.183-217. DOI: http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0881-5_5
45. Dian L, Yu E, Chen X, Wen X, Zhang Z, Qin L, et al. Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles. *NRL.* 2014; 9(1):2406-2417. DOI: 10.1186/1556-276X-9-684
46. Bhuptani RS, Jain AS, Makhija DT, Jagtap AG, Hassan PAR, Nagarsenker MS. Soluplus based polymeric micelles and mixed micelles of lornoxicam: design, characterization and *in vivo* efficacy studies in Rats. *IJPER.* 2016; 50(2):277-286. doi:10.5530/ijper.50.2.8
47. Elsässer B, Schoenen I, Fels G. Comparative theoretical study of the ringopening polymerization of caprolactam vs caprolactone using QM/MM methods. *ACS Catal.* 2013; 3:1397-1405. <https://doi.org/10.1021/cs3008297>
48. Takahashi C, Saito S, Suda A, Ogawa N, Kawashima Y, Yamamoto H. Antibacterial activities of polymeric poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and Soluplus® micelles against *Staphylococcus epidermidis* biofilm and their characterization. *RSC Adv.* 2015; 5:71709-71717. <https://doi.org/10.1039/C5RA13885J>
49. Wegmann M, Parola L, Bertera FM, Taira C, Cagel M, Buontempo F, et al. Novel carvedilol paediatric nanomicelle formulation: *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. *J Pharm Pharmacol.* 2017; 69(5):544-553.
50. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med.* 2015; 11:313-327. DOI: 10.1016/j.nano.2014.09.014

51. Guisasola-Cal E. Nanotransportadores basados en sílice mesoporosa para tratamiento antitumoral. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
52. Shao D, Li M, Wang Z, Zheng X, Lao YH, Changet Z, et al. Bioinspired diselenide-bridged mesoporous silica nanoparticles for dual-responsive protein delivery. *Adv Mater*. 2018; 30(29):1-8. <https://doi.org/10.1002/adma.201801198>
53. Wu SH, Mou CY, Lin HP. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2013; 42(9):3862-3875. <https://doi.org/10.1039/C3CS35405A>
54. Stewart CA, Finer Y, Hatton BD. Drug self-assembly for synthesis of highly loaded antimicrobial drug-silica particles. *Sci Rep -UK*. 2018; 8:895-907. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19166-8>
55. Yang H, Wang S, Han L, Peng W, Yi L, Guo R, et al. Chlorhexidine-encapsulated mesoporous silica modified dentin adhesive. *J Dent*. 2018; 78, 83-90. DOI: 10.1016/j.jdent.2018.08.012
56. Zhang J, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen Z, et al. Antibacterial dental composites with chlorhexidine and mesoporous silica. *J Dent Res*. 2014; 93:1283-1289. DOI: 10.1177/0022034514555143
57. Lu MM, Ge Y, Qiu J, Shao D, Zhang Y, Bai J, et al. Redox/pH dual-controlled release of chlorhexidine and silver ions from biodegradable mesoporous silica nanoparticles against oral biofilms. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13:7697-7709. DOI: 10.2147/IJN.S181168
58. Umerska A, Strandh M, Cassisa V, Matougui N, Eveillard M, Saulnier P. Synergistic effect of combinations containing EDTA and the antimicrobial peptide AA230, an arenicin-3 derivative, on gram-negative Bacteria. *Biomolecules*. 2018; 8(4):122-135. doi: 10.3390/biom8040122
59. Loretz, B, Bernkop-Schnürch A. *In vitro* evaluation of chitosan-EDTA conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system. *AAPS J*. 2006; 8:756-764. DOI: 10.1208/aapsj080485
60. Zhang R, Chen M, Lu Y, et al. Antibacterial and residual antimicrobial activities against *Enterococcus faecalis* biofilm: A comparison between EDTA, chlorhexidine, cetrimide, MTAD and QMix. *Sci Rep*. 2015;5(12944):1-5. <https://doi.org/10.1038/srep12944>
61. Rasimick BJ, Nekich M, Hladec MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod*. 2008; 34(12):1521-1524. DOI: 10.1016/j.joen.2008.08.039
62. Griesser J, Hetényi G, Kadas H, Demarne F, Jannin V, Bernkop-Schnürch A. Self-emulsifying peptide drug delivery systems: How to make them highly mucus permeating. *Int J Pharm*. 2018; 538(1-2):159-166. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.018
63. Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: theory and *in vitro* experimental measurement. *AIChE J*. 1975; 21(5):985-996.
64. Dhiman S, Singh GT, Rehni AK. Transdermal patches: a recent approach to new drug delivery system. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(5):26-34.
65. Bajaj H, Kumar T, Singh V. Film forming gels: a review. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2016; 7(4):2085-2091.
66. Rath G, Hussain T, Chauhan G, Garg A, Goyal AK. Development and characterization of cefazolin loaded zinc oxide nanoparticles composite gelatin nano fiber mats for postoperative surgical wounds, *Mater Sci Eng C*. 2016; 58:242-253. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.050>
67. Pandharipande SL, Bhagat PH. Synthesis of chitin from crab shells and its utilization in preparation of nanostructured film. *Synthesis*. 2016; 5(5):1378-1383.
68. Carhuapoma W, Santiago J, Caracterización de hidrogeles de Quitosano-Alcohol Polivinílico obtenidos por radiación gamma. *Reviberpol*. 2005; 6(4):333-346.
69. Kumar PTS, Lakshmanan VK, Anilkumar TV, Ramya C, Reshmi P, Unnikrishnan AG, et al. Flexible and microporous chitosan hydrogel/nanoZnO composite bandages for wound dressing: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2012; 4:2618-2629. <https://doi.org/10.1021/am300292v>

- 70.** Vicentini DS, Smania A., Laranjeira MCM. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. *Mater Sci Eng C*. 2010; 30:503-508. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.026>.
- 71.** Lapeña Luzón T. Desarrollo de un *scaffold* celular para un modelo de lesión medular. [Trabajo final de grado]. Valencia: Universitat Politècnica de València; 2017.
- 72.** Ravichandran R, Sundarrajan S, Venugopal JR, Mukherjee S, Ramakrishna S. Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications. *Macromol Biosci*. 2012; 12(3):286-311.
- 73.** Rai V, Dilisio MF, Dietz NE, Agrawal, DK. Recent strategies in cartilage repair: a systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *J Biomed Mat Res Part A*. 2017; 105(8):2343-2354.
- 74.** Arán Aís F. Síntesis y caracterización de poliuretanos termoplásticos que contienen resinas de colofonia y su aplicación como adhesivos. [Tesis doctoral]. Universidad de Alicante. Departamento de Química Inorgánica; 2000.
- 75.** Wendels S, Avérous L. Biobased polyurethanes for biomedical applications. *Bioactive Materials*. 2021; 6:1083-1106. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.10.002>
- 76.** Grecka K, Szweda P. Synergistic Effects of Propolis Combined with 2-Phenoxyethanol and Antipyretics on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutics*. 2021; 13:198-215. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020215>

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v62i4.20843

Artículos de revisión

General aspects about *Allium sativum* – a review

Aspectos generales del *Allium sativum* - una revisión

Arlene Loría Gutiérrez¹  0000-0002-5059-8026

Jeimmy Blanco Barrantes¹  0000-0001-5471-8948

Marta Porrás Navarro¹  0000-0001-5626-1005

María Celeste Ortega Monge¹  0000-0002-8384-9987

María José Cerdas Vargas¹  0000-0001-7296-7980

German L Madrigal Redondo¹  0000-0002-9856-4044

¹Universidad de Costa Rica, Facultad de Farmacia, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), San José, Costa Rica.

Correspondence

German L Madrigal Redondo
german.madrigal@ucr.ac.cr

Received: 18.03.2021

Accepted: 09.09.2021

Published: 20.09.2021

Financing

Universidad de Costa Rica, INIFAR

Conflict of interests

The authors have not reported a conflict of interest

Acknowledgment

We thank INIFAR (Instituto de Investigaciones Farmacéuticas) and Dr. German Madrigal for all the support.

Resumen

Introducción: El ajo ha sido utilizado como alimento y planta medicinal a través de los años. Se le atribuyen cualidades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, razón por la que es ampliamente recomendado en el tratamiento de enfermedades como asma, bronquitis, influenza, entre otras.

Método: El objetivo de este estudio fue realizar una revisión y análisis de la literatura relacionada con el uso medicinal del ajo, y su potencial como agente terapéutico e inmunoestimulante en diferentes enfermedades y condiciones de salud. La búsqueda de literatura se realizó en las bases de datos de Medline a través del buscador Pubmed, Scielo, Clinical Key y ClinicalTrials.gov, entre otros.

Resultados: La información consultada respalda los beneficios para la salud asociados con el consumo del ajo. La trituración de los bulbos de ajo permite la obtención de aliína, que al sufrir oxidación enzimática, se convierte en alicina. Este compuesto tiene un rol fundamental en las propiedades medicinales del ajo y se dice que la actividad de esta planta medicinal radica en su capacidad de producir alicina. Estudios preclínicos han demostrado el mejoramiento del sistema inmune y se han identificado proteínas específicas asociadas a su efecto inmunoestimulante. En estudios clínicos se han administrado suplementos con derivados de ajo y se ha observado una disminución en la incidencia de influenza y enfermedades respiratorias agudas.

Conclusiones: El ajo ha demostrado tener un potencial clínico muy importante en el tratamiento de gran cantidad de enfermedades. Se han observado efectos inmunomoduladores y en la prevención de enfermedades respiratorias agudas de origen viral.

Palabras clave: Ajo; Inmunoestimulante; Terapéutico; *Allium sativum L.*

Abstract

Introduction: Garlic has been used as a food and medicinal plant through the years. Antimicrobial, antiviral, and immunostimulatory effects are attributed to garlic, so it is widely recommended to treat diseases like asthma, bronchitis, influenza, and some others.

Method: This work's objective was to conduct a literature review and analysis related to garlic medicinal-use, and its potential as a therapeutic agent and immunostimulant in different diseases and health conditions. The literature review was carried out in the databases Scielo, Clinical Key, Medline and ClinicalTrials.gov, among others.

Results: The information consulted supports the health benefits associated with garlic consumption. The crushing of garlic bulbs allows obtaining alliin, which turns into allicin due to enzymatic oxidation. This compound has a fundamental role in the garlic's medicinal properties, and the garlic plant's activity depends on its ability to produce allicin. Preclinical studies have shown the improvement of the immune system, and specific proteins associated with its immunostimulating effect have been identified. In clinical studies, supplements with garlic derivatives have been administered to patients, and a decrease in the incidence of influenza and acute respiratory diseases has been observed.

Conclusions: Garlic has been shown to have a significant clinical potential to treat many diseases, and immunomodulatory effects and viral acute respiratory disease prevention have been observed.

Keywords: Garlic; Immunostimulant; Therapeutics; *Allium sativum L.*

Highlights

Garlic is an herbal medicine traditionally used to treat infections, asthma, bronchitis, influenza, and colds. There is scientific evidence that supports garlic and derivatives to treat different affections. The evidence ranges from *in vitro* studies to human studies (clinical studies).

Alliin and allicin are compounds derived from garlic and are usually incorporated as active pharmaceutical ingredients into formulations due to the biological activity demonstrated.

This study was a bibliographic review of clinical and preclinical studies about garlic, and greater emphasis is placed on studies investigating the immunostimulating effect of garlic. The main contribution of this work is the information and scientific evidence compilation and presentation in a single document that presents the beneficial effects of garlic for health.

In this work, a bibliographic review was carried out on the general aspects of garlic, and its immunostimulating activity was given main importance. The review's objective is to provide the information necessary to facilitate the formulation processes of natural medicinal products based on garlic. This work is considered a starting point for developing new formulations and products with garlic and its derivatives for the treatment of different health conditions.

Introduction

Medicinal plants have been used since ancient times in the treatment of various diseases. Commonly, these plants have been associated with therapeutic purposes. In addition, their active ingredients are used as a raw material for the development of medicines. However, in many cases these plants are used without noticing the adverse effects or contraindications; for this reason, it is fundamental to have access to scientific information that supports the proper use of medicinal plants and their derivatives.

One of the most used plants either for culinary reasons or as a medicinal plant is garlic. Multiple studies have shown the medicinal properties of the bulb of this plant, such as antimicrobials, expectorants, antiseptics, and antifungals. It is also an easily accessible plant that has been commonly used in the treatment of respiratory diseases such as asthma and bronchitis.

This literature review aims to investigate the benefits of garlic as a potential therapeutic agent and immunostimulant in different diseases and health conditions.

Garlic

The garlic's scientific name is *Allium sativum* L. (Liliaceae)⁽¹⁾. It can also be found as camphor of the poor, nectar of the gods, majo, poor's molasses, rustic molasses, smelly rose⁽²⁾. However, the common name by which it is known in Costa Rica is garlic. The bulb is used for medicinal effects. Alliin and allicin are usually used as active ingredients in different formulations⁽¹⁾.

Garlic is one of the oldest medicinal foods and one of the most researched plants in the world. Due to its wide recognition and cultivation, there is little chance of adulteration with other species. However, garlic used in dietary supplements is handled more carefully than garlic used in commodity spices, it is to preserve the activity of allinase, and subsequently, allicin performance since allinase is sensitive to heat and bruise decomposition⁽³⁾. Likewise, garlic has a strong smell and a pungent flavor that characterizes it⁽²⁾.

Garlic is a herbaceous plant with bulbs composed of numerous fibers divided and wrapped in whitish skin. In addition, it contains 4-6 segments with a characteristic spicy flavor. This perennial herb has a cylindrical stem 50 cm high and sparse, flat leaves 2-3 cm wide. It has sparse flowers in a lilac / pink corolla, and in some cases, the flowers are replaced by bulbs^(3,4). It should be noted that the flowers are rarely open and can wilt in the bud. The flowers are on thin pedicels, consisting of six-segment perianth approximately 4-6 mm long. The fruit is a small loculicidal capsule, and the seeds are rarely produced⁽²⁾.

Garlic is from Siberia and was domesticated in Central Asia. Nomadic tribes have spread it, as it has been cultivated and used in all cultures for more than 5,000 years. It was introduced in America in the XV century⁽¹⁾.

Garlic is grown in loose, rich, silty-sandy, humid, deep, drained soil; mountainous areas with the temperate or cold climate at 1,000-2,400 meters above sea level. It is propagated by bulbils that are sown in full sun; requires abundant water and fertilization. As they mature, the bulbs are dug up and stored in a cool, ventilated place, often cured with smoke that decreases weight loss and partially inhibits germination; teeth become dehydrated ground or flaked⁽¹⁾.

Taxonomy⁽⁵⁾

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Infrakingdom: Streptophyta

Division: Tracheophyta

Subdivision: Spermatophytin

Class: Magnoliopsida

Superorder: Liliales

Order: Asparagales

Family: Amaryllidaceae

Genus: *Allium*

Species: *A. sativum*

Composition

Allium sativum bulb contains sulfur compounds such as ajoene and derivatives, allicin, allyl-methyl trisulfide and derivatives, diallyl disulfide and derivatives, dimethyl sulfide, allyl-methyl disulfide and derivatives, dimethyl thiosulfonate and derivatives, amino acids derived from cysteine and anthocyanins, sulphurated amino acids: alliin (by enzymatic oxidation it becomes allicin, intermediate in the formation of allyl disulfide derivatives, final constituents of essential oil), 5-butyl-cysteine sulfoxide and derivatives, lipids such as cerebrosides, steroids, prostaglandin A, B, E, and F; alkaloids such as phosphatidylcholine, nicotinic acid, diterpenes (gibberellin A-3 and A-7); carbohydrates such as allium fructans; saponins: derivatives of erubioside, sativoside, and tigonine⁽⁴⁾.

Now, from 100 g of bulb (117 kcal), you will find: 67.8% water, 3.5% protein, 0.3% fat, 27.4% carbohydrates, 0.7% fiber, 1% ash, 18 mg calcium, 88 mg phosphorus, 1.5 mg iron, 18 mg sodium, 373 mg potassium, 0.24 mg thiamine, 0.05 mg riboflavin, 0.4 mg niacin, and 10 mg ascorbic acid⁽⁴⁾.

It should be noted that the antimicrobial activity is attributed to alliin, a sulfoxide that by alliinase action is converted to allicin and allyl and ajoene disulfide. Antimicrobial activity is also attributed to alixin and garlicin that are obtained by severe bulb treatments. Ajoene is an antithrombotic factor whose action involves fibrinogen receptors on platelets and prevents platelet aggregation; It reduces arachidonate metabolism by inhibiting the enzymes' prostaglandin synthetase and 5-lipoxygenase and has shown a promising role in the treatment of leukemia. Fructosans inhibit adenosine deaminase by participating in the regulation of the processes in which adenosine is involved⁽¹⁾.

Traditional use

Garlic has been used as herbal medicine to treat asthma, bronchitis, influenza, and colds⁽¹⁾. Besides, it serves as a treatment for respiratory infections⁽²⁾. It is commonly used to treat bronchopulmonary diseases as expectorant antiseptic and asthma. Likewise, it is used as a hypotensive, diaphoretic, and vermifuge⁽⁶⁾.

The most commonly used form of garlic extraction is maceration⁽⁷⁾. There are several variants to this method, depending on the amount of plant material and the concentration of the extract required, however, all methods of this type have in common that the extraction solvent can be water (aqueous extract), alcohol (ethanolic extract) or a hydroalcoholic combination.

One way of making the macerated garlic extract is by using the garlic bulb (bulb extract) since these are the parts of the garlic with the highest biological activity. For the preparation, the garlic is peeled, cut into slices, and stored for 40 days at a temperature of 60-70°C, then suspended in a hydroalcoholic solution. After this time, the processed garlic is suspended in an anaerobic maceration for 18 weeks, at the end of which period they are filtered and rotavaporated; the liquid extract obtained should be kept refrigerated⁽⁸⁾. Another way to make this liquid extract is in cold in a conical flask for 72 hours⁽⁷⁾.

Spray drying is another way of making garlic extracts, this technique is performed on the liquid extracts, to obtain a dry extract in a solid matter form. It consists of atomizing it in the form of small drops in a dry medium, dehydrating it employing hot air, and turning it into powder or tiny spheres⁽⁷⁾.

Toxicology

Studies carried out found that the LD50 of the bulb by oral and subcutaneous route to rats of both sexes was higher than 30 mL/kg. The aqueous extract from the bulb elicited *in vitro* uterotonic activity on the pregnant female mouse's uterus. Furthermore, the bulb extract (2g/kg) administered in rats five times a week for six months showed no toxic effects. Externally, poultices with high concentrations of bulb extract can cause skin necrosis and allergenic activity. The latter has been verified with the internal administration of the aqueous extract orally in rats and sensitive humans⁽⁴⁾.

Similarly, the oral bulb can irritate the urinary tract in people with specific sensitivity. A dose of 350 mg/person (both sexes from 30 to 62 years old) administered twice a day did not produce toxic manifestations. No information evidences the safety of its medicinal use in children, pregnancy, or lactation⁽⁴⁾.

In another study, it was shown that the ethanolic extract is not mutagenic in *S. typhimurium*. The LD50 of mouse allicin is 60 mg/kg IV and 120 mg/kg SC; the LD50 of the oil is 50-78 mg/kg IV; the LD50 of neoallicin is 70 mg/kg IV and 600 mg/kg orally. Oral administration is not genotoxic by testing the micronucleus in the bone marrow and inducing changes in sister chromatids in spermatogonia. Due to prolonged traditional use, daily consumption does not pose any health risk⁽¹⁾.

Contraindications

Conditions and diseases such as hyperthyroidism, active bleeding and, thrombocytopenia are contraindicated. Do not prescribe the oil during pregnancy⁽¹⁾. It is contraindicated in patients with a known garlic allergy. Besides, other contraindications include acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), surgery, and diabetes mellitus⁽⁹⁾.

Until more data becomes available, people with *diabetes mellitus* have to be careful when taking dietary supplements containing garlic and follow their normally recommended blood glucose control strategies. Because garlic components inhibit platelet aggregation, care must be taken in patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy⁽⁹⁾. Despite this, garlic's safety level is reflected in its worldwide use as a condiment in food⁽²⁾.

Warnings

The juice and oil irritate the mucosa and the conjunctiva⁽¹⁾. Additionally, consuming large amounts of garlic can increase the risk of postoperative bleeding. Also, ingesting fresh garlic bulbs, extracts, or oil on an empty stomach can cause heartburn, nausea, vomiting, and diarrhea⁽²⁾.

Side effects

Case reports have highlighted the possibility that the use of garlic may cause allergic reactions (allergic contact dermatitis, generalized urticaria, angioedema, pemphigus, anaphylaxis, and photoallergy), impaired platelet function, and clotting (with a possible risk of bleeding)^(10,11) and burns (when fresh

garlic is applied to the skin, particularly under occlusion dressings). It should be noted that garlic can cause bad breath or body odor, so many people decide not to consume it⁽¹⁰⁾. The oral bulb can irritate the urinary tract in people with specific sensitivity⁽⁴⁾. Furthermore, the use of garlic in some cases evokes asthmatic attacks after inhalation of the drug powder⁽²⁾.

The most common effects associated with the use of garlic in therapeutic doses are mild gastrointestinal, such as nausea, bloating, flatulence, dyspepsia, nausea, vomiting, diarrhea, and pyrosis. Severe gastrointestinal adverse effects can also be found, such as small bowel obstruction, epigastric and esophageal pain, hematemesis, and hematochezia. It can also cause hypotensive effects, heart attack, and Meniere's disease⁽¹⁰⁾.

Pregnancy and lactation

Garlic is safe during pregnancy in amounts that are generally eaten in food. However, garlic supplements or large amounts of garlic should be avoided during pregnancy due to a possible increased risk of bleeding or stimulation of uterine contractions⁽¹²⁾. During lactation, there are no known contraindications. The excretion of the components of garlic in breast milk and its effect on the newborn has not been established⁽²⁾.

Interactions with other drugs

Garlic causes a harmful effect related to kidney damage and nephrotoxicity combined with statins⁽¹³⁾. Clinical evidence suggests that taking garlic may result in pharmacokinetics or pharmacodynamic interactions that could represent a potential risk to patients taking conventional medications, particularly in subjects treated with anticoagulants. Blood clotting time has been reported to double for patients taking warfarin and garlic supplements⁽¹⁰⁾.

Additionally, interactions with antiretroviral therapies may occur. A severe drug interaction has been reported between garlic and an HIV protease inhibitor, saquinavir; this interaction may compromise antiretroviral therapy's effectiveness and lead to higher drug resistance rates against the acquired immunodeficiency virus. Other conventional medications that could interact with garlic include the anti-diabetic chlorpropamide and the pain reliever paracetamol⁽¹⁰⁾.

Dosage and administration

Studies report the use of 4-12.3 mg/day of garlic oil orally.

Adults: The World Health Organization (WHO) recommends 2 to 5 grams of fresh garlic, 0.4 to 1.2g of dry powder, 2 to 5 mg of oil, 300 to 1,000 mg of extract, equivalent to 2- 5 mg alliin/day.

6-10 mg alliin (approx. 3-5 mg alliin) daily, typically contained in one clove of garlic or 0.5-1.0 g of dry garlic powder⁽⁶⁾.

2 to 4 grams of the dry bulb or 2 to 4 milliliters of tincture (1:5 dilution in 45% ethanol) orally three times a day for upper respiratory tract infections⁽⁶⁾.

Pediatrics: dry extract is recommended as a single dose (100 – 200 mg) once or twice a day. The daily dose is 100-400 mg. The herbal substance powder or the liquid extract of garlic is not recommended in children and adolescents under 18 years of age⁽¹⁴⁾.

Geriatric: liquid extract is recommended as a single dose (110 – 220 mg) 4 times a day. The daily dose is 440 – 880 mg. The dry extract is recommended as a single dose (100 – 200 mg) once or twice a day. The daily dose is 100 – 400 mg⁽¹⁴⁾.

Methods

We performed a literature review and analysis of Garlic medicinal use. The databases consulted in the searching process were Medline, Scielo, Clinical Key, and the consulted languages were English and Spanish using the following Medical Subject Heading (MeSH) terms and keywords: Ajo or garlic or Al-

lium sativum L., Inmunoestimulante, Sistema immune or Immune System and Inmunoestimulador or Immunostimulator. Moreover, we searched the United States Patent and the ClinicalTrials.gov website to find patents and Clinical trials about garlic´s medicinal use.

The eligibility criteria of consulted material include original studies describing preclinical (*in vivo* and *in vitro*) and clinical studies about garlic´s pharmacological use. Moreover, we included information from review papers, scientific communications, books, monographs, and pharmacopeia. Furthermore, studies describing the medicinal use of garlic combined with another component were excluded.

For the Medline database, using the keywords “garlic” and “immunity”, 29 results were found and only 4 articles were used. The keywords, “garlic” and “cold”, were also used, where 7 results were found, and only 3 were used. In addition, with the keywords “garlic” and “antiviral”, 9 results were found and only 2 articles were used. Additionally, the keywords “garlic”, “immunomodulatory”, and “protein” were used, 8 results were found; however, only 1 article was used.

To define the different garlic extracts, a search was performed in the Scholar Google database, using the keywords “extract” and “garlic”, 16 articles were found, of which only 2 were used.

Results

Preclinical Studies

Garlic is well-known for improving the immune system. A preclinical study was done to examine the protein fraction changes during garlic aging and identify immunomodulatory proteins. The modifications that occur in garlic during the aging process were studied by protein quantification and gel electrophoresis. Purification and identification of immunomodulatory proteins have been achieved by Q-Sepharose chromatography and mitogenic activity. In the study, only two main proteins (range of 12–14 kDa by SDS-PAGE) were observed in aged garlic extract (AGE). The purified protein components QA-1, QA-2, and QA-3, showed immunomodulatory and mannose-binding activity; QA-2 showed the highest mitogenic activity. The QA-2 and QA-1 proteins' identity with the ASA I and ASA II garlic lectins, respectively, was confirmed by hemagglutination analysis. QA-3 exhibited mitogenic activity but not hemagglutination activity⁽¹⁵⁾.

Another study was done on the enteric-coated garlic supplement, which is a kind of garlic preparation based on garlic oil and garlic powder compressed in tablets, with a remarkable improvement in normal mice's immunocompetence. In the study, garlic oil was extracted from the fresh garlic bulb by steam distillation and complexed with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin using a method of high-energy ball milling to then incorporate the inclusion complex with enteric-coated powder and reduce its gastrointestinal irritant. Based on the maximum tolerance dose test, mice that took an enteric-coated garlic tablet by gavage at a dose of 3 g/kg body weight did not show symptoms of acute toxicity⁽¹⁶⁾.

In this study, experimental animals were randomly assigned. Different doses of garlic tablets for 30 consecutive days were given orally. Furthermore, their immune functions were comprehensively analyzed. Compared to the control, the garlic tablet significantly improved ConA-induced splenic lymphocyte proliferation, serum hemolysin production, the number of hemolytic pest-forming cells, peritoneal macrophages phagocytic activity, and the rate of carbon removal at the dose of 400, 600 mg/kg of body weight. It also improved the DNFB-induced delayed-type hypersensitivity reaction and NK cells' cytotoxicity at the 600 mg/kg body weight dose. In addition, garlic tablets increased serum cytokine secretion (TNF- α , IL-2) in a dose-dependent manner⁽¹⁶⁾.

A study was conducted to evaluate the inhibitory effects of garlic extract on avian infectious bronchitis virus. For this purpose, four groups of chick embryonic eggs were used, where the first group was used for virus titration; the second group was given the mixture of different titrations of virus and garlic extract; the third group received a virus titration and after 8 hours received garlic extract and the last group received different dilutions of garlic extract. According to the results of the study, it was shown that garlic extract influences the garlic virus in the replication phase. In addition, avian infectious bronchitis virus RNA and virus replication were dose-dependently decreased⁽¹⁷⁾.

A preclinical study hypothesized that allicin can alleviate immune dysfunction caused by the reticuloendotheliosis virus (REV). For this purpose, 240 White Leghorn SPF chickens were used and divided into 5 treatment groups and one control group. It was found that treatment with allicin enhanced the proliferation of lymphocytes infected with this virus, demonstrating that allicin helps to alleviate the growth inhibition induced by REV infection and immune system dysfunction. In addition, it was shown that in the groups treated with allicin, the expression of inflammatory cytokines produced by REV infection was decreased. It was also found that allicin significantly reduced the oxidative stress caused by REV infection⁽¹⁸⁾.

In a preclinical study, the effect of the 14 kDa protein isolated from AGE on the maturation and immunomodulatory activity of dendritic cells (DC) was studied to prove its immunomodulatory effects. Biochemical methods were used to purify the AGE protein; the semi-purified 14 kDa protein was run on gel filtration Sephadex G50 and checked for purity by SDS-PAGE. DC was separated from the spleen of BALB / c mice by Nycodenz centrifugation and adhesion to plastic plates. The 14 kDa AGE protein was added to the overnight culture of the DC medium and the expression percentages of CD40, CD86, and MHCII were evaluated by flow cytometric analysis. In addition, T-cell proliferation was measured by the mixed allogeneic lymphocyte reaction (MLR) test. Despite the results, more research has to be done to conclude if the 14 kDa protein isolated from AGE induces DC maturation and increases immunostimulatory activity⁽¹⁹⁾.

On the other hand, an in vivo study carried out with Wistar rats evaluated the effects of garlic oil on the serum levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-5. Obtaining as a result that the garlic oil increased the levels of IFN- γ and TNF- α to 2 and 3 times those of the control group (which were only treated with corn oil) respectively. It also produced a slight increase in IL-5 levels. In addition, the effect of this oil on IgG and IgM levels was determined, where an increase of approximately 60% in IgG levels was obtained as a result, but a significant increase in IgM levels was not registered⁽²⁰⁾.

Similarly, the effect of garlic oil on mRNA expression levels in interleukins 2, 4, and 5 in rat leukocytes was evaluated and it was determined that it decreases the expression levels of these interleukins in contrast to the control group⁽²⁰⁾.

Clinical Studies

A study at the University of Florida recruited 120 healthy subjects (60 per group) to determine the effect of consuming supplements with AGE (2.56 g/d) on immune cell proliferation and cold symptoms, and flu. After 45 days of AGE consumption, $\gamma\delta$ -T and NK (natural killer) cells thrived better and were more activated than cells in the placebo group⁽²¹⁾. After 90 days, the AGE group showed a reduction in the severity of the cold and flu, a reduction in the number of symptoms, the number of days the participants functioned suboptimally, and the number of days of work school missed^(22,23).

Moreover, a clinical study evaluated the effects of allicor, a long-acting garlic tablets, on acute respiratory viral infection incidence in children. For the first stage, allicor tolerance (600 mg/day) and its effects on ARD morbidity were investigated in a 5-month open study in 172 children and adolescents aged 7 to 16, compared to 468 individuals in a control group; however, this was not observed to induce gastrointestinal side effects in children at any dose, while ARD morbidity was reduced 2 to 4-fold compared to controls. In the second stage, allicor (300 mg/day) effects on morbidity from ASRD were investigated in a 5-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. This study included 42 children aged 10-12, compared to 41 placebo-treated children and 73 children treated with benzimidazole. For this stage, allicor reduced ARD morbidity 1.7 times compared to placebo and 2.4 times compared to benzimidazole. Furthermore, there was no significant difference in ARD morbidity between the placebo and benzimidazole groups⁽²⁴⁾.

Similarly, a clinical trial regarding the prevention of the common cold was performed with a garlic supplement. A sample of 146 people was used; there were two groups, volunteers who were going to receive a placebo; and the second group of participants received a garlic-containing supplement (allicin) for 12 weeks. The researchers used a five-point scale to assess their health and recorded all infections and symptoms of the common cold⁽²⁵⁾.

Through a clinical study, the effect of garlic (*Allium sativum*) on the gene expression of pro and anti-inflammatory cytokines was evaluated, for which peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from donors in optimal health conditions were treated. Treatment with garlic provided satisfactory results since it significantly stimulated the expression of said cytokine in 4 of the 6 study participants. In these donors, an increase in IL-17 transcription was detected thanks to the treatment with garlic⁽²⁶⁾.

Discussion

Aged garlic extract is composed of low molecular weight immunomodulatory proteins, transformed organosulfur compounds, fructans, and some amino acids and their derivatives. According to the aforementioned preclinical studies, the potent immunomodulatory activity of AGE is due to the immunomodulatory proteins garlic agglutinins ASA I and II. Due to the above, garlic can contribute to the treatment and prevention of certain diseases caused by immune dysfunction⁽¹⁵⁾. Also, it was demonstrated that dietary supplementation with garlic tablets could improve the function of the mononuclear phagocytic system, cell-mediated immunity, and humoral immunity of normal mice to varying degrees. In addition, it significantly increased serum cytokine secretions (TNF- α , IL-2) in a dose-dependent manner. Importantly, to see improvements in immune functions *in vivo*, enteric-coated garlic tablets need to be developed as an economical and potential functional food⁽¹⁶⁾.

On the other hand, it was demonstrated that garlic extract has an inhibitory effect on avian infectious bronchitis virus in its replication phase since when garlic extracts were used, a significant decrease of the virus was found in a dose-dependent manner⁽¹⁷⁾. Likewise, allicin, which is one of the main components of garlic, has been shown to significantly reduce immunosuppression induced by the reticuloendotheliosis virus, help reduce inflammation and alleviate oxidative stress produced by this virus. In addition, allicin blocks the ERK/MAPK pathway during infection and has antioxidant activity, which allows it to function as an antiviral⁽¹⁸⁾.

Furthermore, results suggest that AGE consumption may improve immune cell function and be responsible for reducing the severity of reported colds and flu. These results also suggest that the immune system works well with AGE supplements, with less subsequent inflammation^(22,23). Correspondingly, the consumption of allicin was proven as an effective tool for the nonspecific prevention of acute respiratory infections in children; also, it did not show side effects⁽²⁴⁾. In the same manner, in a clinical trial, the active treatment group had significantly fewer colds than the placebo group, while the placebo group recorded significantly more days of viral exposure and a significantly longer duration of symptoms. Thus, volunteers in the active group were less likely to catch a cold and recover faster if infected, meaning that a supplement containing allicin may prevent the common cold virus effects⁽²⁵⁾.

Through the results obtained, it is concluded that garlic oil can modulate the immune response in rats. It should be noted that the decrease in IFN- γ levels due to the administration of garlic oil is an indicator of the effect it exerts against the deviation of the immune response. In addition, this oil can stimulate the activity of basal macrophages. Finally, it was determined that this oil has immunomodulatory properties due to the balance that is exerted on the elevation of IgG and IgM⁽²⁰⁾.

The results indicated that the garlic extract did not impair the proliferation of both human CD8 + and CD4 + T cells. Furthermore, no significant effects were found on IL-4 gene expression, but IL-17. The foregoing refers to the fact that the results obtained determined the inhibition of the pro-inflammatory cytokine (IL-17), which could be beneficial to regulate its potential and thereby control various autoimmune and inflammatory diseases. IL-17 plays a very important role in inflammation of the Central Nervous System as in multiple sclerosis, since it has a close relationship with active lesions. It is also part of the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and high levels of this cytokine have been found in various types of tumors. Therefore, this plant has great potential for the treatment of inflammatory diseases and cancer, due to the inhibition of IL-17⁽²⁶⁾.

Conclusion

Garlic is shown to have significant clinical potential in treating a wide variety of diseases. Different studies have indicated that garlic is attributed a potentiating effect on the mononuclear phagocytic system, which is related to an improvement in the body's immune functions. Likewise, proteins that have a link with the immunomodulatory properties related to garlic have been identified. In a study on the effect of garlic tablets (allicor) in the child population, the efficacy of treatment in preventing acute respiratory viral infections was determined. Garlic has also been linked in other studies for reducing the severity of symptoms of the common cold in experimental subjects.

Although garlic is believed to be a safe substance, it is necessary to clarify that garlic supplements are contraindicated in pregnant women due to a possible uterine contraction stimulation. Nor is the use of garlic powder and liquid extract recommended for those under 18 years of age. Also, because the components described in garlic inhibit platelet aggregation, special care must be taken in its administration to patients with anticoagulants or thrombolytic therapies.

Bibliography

1. Vanaclocha B, Cañigüeral S. Fitoterapia, Vademécum de prescripción. 5ª ed. Barcelona: Elsevier; 2019.37p.
2. World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol 1. Geneva; 1999. p.16-26.
3. Upton R, Graff A, Jolliffe G, Langer R, Williamson E. American Herbal Pharmacopeia. Estados Unidos de América: CRC Press Taylor & Francis Group; 2011.
4. Germosén L. Farmacopea Vegetal Caribeña. 2ª ed. Santo Domingo: Tramil; 2005. p.36-40.
5. Integrated Taxonomic Information System [Internet]. Itis.gov. 2020. Available from: <https://www.itis.gov/>
6. *Allii sativi* bulbus (Garlic). ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products; 2019
7. Santander A. Proceso de elaboración de un ungüento con acción antifúngica a partir un extracto seco de ajo (*Allium sativum* L.). Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala. 2021.
8. Chaupis D, Rojas J, Gasco M, & Gonzales G. Efecto hipotensor del extracto de ajo (*Allium sativum*) macerado por 18 semanas en un modelo experimental *in vivo*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2014; 31(3), 461-466.
9. *Allium sativum* drug monograph [Internet]. Gold Standard Drug Database; 2018 [Accessed 2 May 2020]. Available from: https://www-clinicalkey-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/#!/content/drug_monograph/6-s2.0-2221
10. Borrelli F, Capasso R, Izzo A. Garlic (*Allium sativum* L.): Adverse effects and drug interactions in humans. Molecular Nutrition & Food Research. 2007;51(11):1386-1397. doi 10.1002/mnfr.200700072
11. Puell L, Bravo F, Del Solar M, Salomón M, Ramos C, Alca E. Dermatitis de contacto alérgica debido al ajo (*Allium sativum* L). Folia Dermatología. 2007; 18(2): 72-76
12. O'Mathuna D, Larimore W. Alternative Medicine: The Christian Handbook. Zondervan; 2006. p.346-349.
13. Kansara M, Jani A. Possible interactions between garlic and conventional drugs: a review. Pharmaceutical and Biological Evaluations. 2017;4(2):73. doi:10.26510/2394-0859.pbe.2017.12
14. European Medicines Agency. European Union herbal monograph on *Allium sativum* L., bulbs. [monografía en Internet]; 2016 [Accessed April 24, 2020]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/>

en/documents/herbal-monograph/draft-european-union-herbal-monograph-allium-sativum-l-bulbus_en.pdf

15. Chandrashekar P, Venkatesh Y. Identification of the protein components displaying immunomodulatory activity in aged garlic extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;124(3):384-390. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.030>
16. Gu B, You J, Li Y, Duan C, Fang M. Enteric-coated garlic supplement markedly enhanced normal mice immunocompetence. *European Food Research and Technology*. 2009;230(4):627-634. doi: 10.1007/s00217-009-1202-1
17. Mohajer T, Ghalyanchi A, Karimi V, Barin A, Sadri N. The effect of *Allium sativum* (Garlic) extract on infectious bronchitis virus in specific pathogen-free embryonic egg. *Avicenna J Phytomed*. 2016;6(4):458-267.
18. Wang L, Jiao H, Zhao J, Wang X, Sun S, Lin H. Allicin Alleviates Reticuloendotheliosis Virus-Induced Immunosuppression via ERK/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Specific Pathogen-Free Chickens. *Front Immunol*. 2017;8:1856.
19. Ahmadabad HN, Hassan ZM, Safari E, Bozorgmehr M, Ghazanfari T, Moazzeni SM. Evaluation of the immunomodulatory effect of the 14kDa protein isolated from aged garlic extract on dendritic cells. *Cellular Immunology*. January first of 2011;269(2):90-5.
20. Mohamed E, Baiomy A, Ibrahim Z, Soliman M. Modulatory effects of levamisole and garlic oil on the immune response of Wistar rats: Biochemical, immunohistochemical, molecular and immunological study. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14(3):2755-2763. doi: 10.3892/mmr.2016.5551
21. ClinicalTrials.gov: The Effect of Aged Garlic Extract Supplementation on Immune System [Internet]. Percival (MD): National Library of Medicine (US); [Updated November 13, 2013; Accessed May 2, 2020]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01390116>
22. Percival S. Aged Garlic Extract Modifies Human Immunity. *Nutrition Journal*. 2016;146(2):433S-436S. doi: 10.3945/jn.115.210427.
23. Nantz M, Rowe C, Muller C, Creasy R, Stanilka J, Percival S. Supplementation with aged garlic extract improves both NK and $\gamma\delta$ -T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention. *Clinical Nutrition*. 2012; 31(3):337-344. doi: 10.1016/j.clnu.2011.11.019.
24. Andrianova I, Sobenin I, Sereda E, Borodina L, Studenikin M. Efecto de las tabletas de ajo de acción prolongada “allicor” sobre la incidencia de infecciones virales respiratorias agudas en niños. *Therapeutic archive journal*. 2003;75(3):53-6.
25. Josling, P. Prevención del resfriado común con un suplemento de ajo: una encuesta doble ciego controlada por placebo. *Advances in Therapy*. 2001;18(4):189-93.
26. Moutia M, Seghrouchni F, Abouelazz O, Elouaddari A, Al Jahid A, Elhou A et al. *Allium sativum* L. regulates *in vitro* IL-17 gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16(1). doi: 10.1186/s12906-016-1365-9