

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

Ars Pharmaceutica

Vol. 63(4) · Octubre-Diciembre 2022



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, LATINDEX, REDIB, SCIELO, IBECS, MIAR y es nuestra intención aumentar su presencia en otras bases. Se han establecido 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.

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.

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

En el año 2021 se le ha renovado el sello de calidad editorial otorgado por la FECYT, por un periodo de tres años y ha entrado en el nuevo índice de impacto JCI (Journal Citation Indicator), lo que ha supuesto estar dentro de las 357 revista del mundo en el campo de la Farmacología y la Farmacia, recogidas en los JCR de la Web of Science. Por ello desde aquí invitamos a todos los autores a enviar sus aportaciones a las distintas secciones de la revista.

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

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

Equipo Editorial

Directores Honoríficos:

Dr. Jesús Cabo Torres, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España
Dra. María José Faus Dáder, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España
Dr. Fernando Martínez-Martínez, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Director

Dr. Manuel Sánchez Polo, 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

Estudios clínicos

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

Farmacia Clínica

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

Legislación y Gestión farmacéutica

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

Microbiología Clínica

Dra. Belén Juárez Jiménez, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España

Química Farmacéutica

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

Radiofarmacia

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

Salud

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

Tecnología Farmacéutica

Dra. Beatriz Clares Naveros, Tecnología Farmacéutica. Univ. 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. Fernando Fernández-Llímós, Farmacia Social. Univ. de Lisboa, Portugal
Dr. Tomas de Haro, Análisis Clínico. Hosp. Clínico San Cecilio. Granada, España
Dr. Eduardo Luis Mariño, Unidad Farmacia Clínica. Univ. de Barcelona, España
Dra. Lucrecia Moreno, Farmacología. Univ. CEU Cardenal Herrera. Valencia, 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. 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

- 311-319 CELIA CASTAÑO-AMORES, PELAYO NIETO-GÓMEZ, MARÍA TERESA NIETO-SÁNCHEZ, RAQUEL ÁLVAREZ-SÁNCHEZ
Práctica clínica en prevención de migraña con anticuerpos monoclonales del péptido relacionado con el gen calcitonina: real-world evidence
Clinical practice in prevention of migraine with calcitonin-gene related peptide monoclonal antibodies: real-world evidence
- 320-334 PAULA FISCHER, GABRIELA CRISTIANE MENDES GOMES, BIBIANA FRASSON ETCHEVERRY, NATHÁLIA VIEIRA RIOS, PAMELLA EDUARDHA ESPINDOLA CHAVES, EMILY CLORI SOTELO, DYENE NASCIMENTO CAMPOS, LUÍSA ZURAVSKI, TAIANE ACUNHA ESCOBAR, MICHEL MANSUR MACHADO
El extracto de *Momordica charantia* modula la respuesta inflamatoria en linfocitos humanos a través de la supresión de TNF- α
Momordica charantia extract modulates inflammatory response in human lymphocytes via suppression of TNF- α
- 335-344 JENNY HUERTA LEÓN, JHONNEL SAMANIEGO JOAQUIN, DAVID PUMA QUISPE, JOVANA SORIA QUISPE
Quitosano de Cangrejos con actividad antimicrobiana en compotas artesanales de plátanos
Crab chitosan with antimicrobial activity in artisanal banana compotes

- 345-354 TANIA GONZÁLEZ FURELOS, MARÍA SOBRIDO PRIETO, IRIA RODRÍGUEZ LEGAZPI
Intensificación de Ustekinumab en enfermedad de Crohn: Revisión sistemática
Ustekinumab intensification in Crohn's disease: a systematic review
- 355-371 FRANCISCO RIVAS-GARCÍA, RAFAEL GIMÉNEZ-MARTÍNEZ, MARGARITA LÓPEZ-VIOTAGALLARDO
Nutrición parenteral suplementada en el final de la vida: consideraciones nutricionales y tecnológicas.
Supplemented parenteral nutrition at the end-of life: nutritional and technological considerations
- 372-386 NATHALIE VEGA-SÁNCHEZ, MARÍA FERNANDA MONTERO-JARA, REBECA MARÍN-FAJARDO, MARIANELA CHAVARRÍA-ROJAS
Liposomas en el desarrollo de formas farmacéuticas semisólidas
Liposomes in pharmaceutical semisolid dosage forms
- 387-409 GARIMA GUPTA, PULKIT ASATI, PRANJUL JAIN, PRANALI MISHRA, ANKIT MISHRA, PRADEEP SINGOUR
Recent advancements in Cancer Targeting Therapy with the Hyaluronic Acid as a Potential Adjuvant
Avances recientes en la terapia dirigida al cáncer con el ácido hialurónico como adyuvante potencial

doi: 10.30827/ars.v63i4.23848

Artículos originales

Práctica clínica en prevención de migraña con anticuerpos monoclonales del péptido relacionado con el gen calcitonina: evidencias de casos reales

Clinical practice in prevention of migraine with calcitonin-gene related peptide monoclonal antibodies: real-world evidence

Celia Castaño-Amores¹  0000-0003-1711-2730

Pelayo Nieto-Gómez^{2,3}  0000-0003-4154-7937

María Teresa Nieto-Sánchez¹

Raquel Álvarez-Sánchez¹

¹Hospital Universitario San Cecilio, Farmacia hospitalaria, Granada, España.

²Hospital Gutiérrez Ortega, Farmacia hospitalaria, Valdepeñas, España.

³Hospital Santa Bárbara, Farmacia hospitalaria, Puertollano, España.

Correspondencia

Celia Castaño-Amores

Celia_camores@hotmail.com

Recibido: 30.01.2022

Aceptado: 12.08.2022

Publicado: 28.09.2022

Financiación

Sin financiación

Conflicto de intereses

Ninguno

Resumen

Introducción: Los anticuerpos monoclonales (mAbs) del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) son un novedoso tratamiento para prevenir la migraña crónica y la episódica de alta frecuencia.

Método: Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, multicéntrico para analizar la efectividad y seguridad de los mAbs anti-CGRP (erenumab, galcanezumab, fremanezumab). La variable de efectividad fue la reducción en los días de migraña al mes (MMDs). La seguridad se midió con los efectos adversos descritos.

Resultados: Los resultados de 127 pacientes muestran efectividad similar entre erenumab y galcanezumab en la reducción de los MMDs. Una proporción importante de pacientes cambió de mAb por pérdida de respuesta o fallo primario tras una media de 7 meses: 15,11% erenumab; 24% galcanezumab. Algunos pacientes se trataron concomitantemente con toxina botulínica A: 8,13% erenumab; 12% galcanezumab; 6,25% fremanezumab. Más del 60% de pacientes habían sido tratados previamente con toxina botulínica A con falta de respuesta tras varias dosis. Se describieron efectos adversos cardiovasculares (dolor en el pecho, taquicardia) exclusivamente en pacientes con erenumab.

Conclusiones: La práctica clínica actual se basa en el intercambio de mAbs anti-CGRP en casos de falta de respuesta o migraña refractaria, aunque su evidencia es limitada y se ha demostrado que la efectividad entre los tres fármacos es equivalente. Las Agencias Reguladoras recomiendan un período de 12 semanas para evaluar la efectividad del mAb. La mitad de los pacientes refirieron falta de seguimiento por Neurología. Los farmacéuticos clínicos son necesarios en la atención integrada de la migraña.

Palabras clave: Migraña; péptido relacionado con el gen calcitonina; antagonistas del receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

Abstract

Introduction: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) monoclonal antibodies (mAbs) are novel therapeutic option for prevention of chronic migraine (CM) and high-frequency episodic migraine (HFEM).

Method: An observational, retrospective, multicentre, real-world evidence study was developed to analyse the effectiveness and safety of anti-CGRP mAbs (erenumab, galcanezumab, fremanezumab). Effectiveness was measured by monthly migraine days (MMDs) reduction. Adverse events were recorded for safety outcome.

Results: Results from 127 patients showed similar effectiveness between erenumab and galcanezumab in MMDs reduction. A notable proportion of patients switched of mAb because of loss of response or primary no-response after seven months: 15.11% erenumab; 24% galcanezumab. Some patients were concomitant treated with Onabotulinumtoxin A (Onabot A): 8.13% erenumab; 12% galcanezumab; 6.25% fremanezumab. More than 60% of the total were previously treated with Onabot A with loss of response. Cardiovascular adverse events are exclusively reported by erenumab group (chest pain, tachycardia).

Conclusions: Current clinical practice is based on switching of CGRP mAbs after loss of response or refractory migraine, even though evidence for this practice is limited and effectiveness between the drugs has been demonstrated to be equivalent. The period of 12 weeks since the first dose of the CGRP mAb, recommended by Regulatory Agencies, should be respected to determine if the mAb selected is being ineffective. At least, half of the patients complained about lack of follow-up by reference neurologist. Clinical pharmacists are important to help these patients manage the burden of migraine.

Keywords: Migraine; calcitonin gene-related peptide; calcitonin gene-related peptide receptor antagonists

Highlights

The new anti-CGRP monoclonal antibodies are effective in reducing migraine days per month in an equivalent way among them.

Current clinical practice is based on switching between mAbs in patients with refractory migraine, as well as the concomitant use of botulinum toxin A. However, the evidence for these practices is limited.

This study provides the real-world experience of efficacy and safety in migraine prevention with anti-CGRP mAbs. The results show that switching between mAbs is ineffective in reducing MMDS in refractory migraines.

Introduction

Migraine is a chronic neurological disorder consisting of recurring headache of moderate to severe intensity lasting 4-72 hours. The headache is usually unilateral, pulsatile, the pain is often worse with physical activity and is associated with sensibility to light and sound and/or nausea. People who experience frequent attacks of migraine can have either episodic or chronic migraine (CM)^(1,2).

High frequency episodic migraines (HFEM) are defined as headaches occurring less than 15 days per month. CM is defined as headache occurring on 15 or more days per month for more than 3 months⁽¹⁾.

Chronic migraine is usually associated with greater disability and prevalence of comorbidities such as anxiety, depression and other chronic disorders⁽³⁾. This can greatly affect the quality of daily life, generating an important charge for the family and society. Therefore, a treatment approach that considers different therapeutic targets taking into account the pathophysiology of migraine could improve outcomes⁽⁴⁾.

Results from the International Burden of Migraine Study (IBMS)⁽⁵⁾ show that Spain was the country with the highest per patient annual cost in both CM and HFEM compared to other four of the European Union (Italy, Germany, France, UK).

Traditional treatments are not specific for migraine but include antiepileptic drugs, β -blockers and antidepressants^(1,6). These treatments have failed to reduce the economic and social burden of migraine, considered the main cause of neurological disability and one of the main causes of long-term disability. Also, the success of these older drugs has been limited by poor adherence by the patient, low efficacy and tolerability⁽⁷⁾.

Since 2010, OnabotulinumtoxinA (Onabot A) is approved for the prevention of chronic migraine. Onabot A reduces the magnitude of pain signalling in the brain and prevents activation and sensitization of central neurons thought to be involved in migraine chronification⁽³⁾. Thus, it attenuates the release of neuropeptides and neurotransmitters such as glutamate, substance P, and calcitonin gene-related peptide (CGRP)^(3,8).

Recently, direct inhibition of CGRP pathways has emerged as a targeted approach for migraine prevention. In 2018, the FDA approved three drugs, administered subcutaneously, for the preventive treatment of migraine in adults: erenumab, galcanezumab and fremanezumab⁽⁹⁾. These drugs are monoclonal antibodies (mAbs) antagonists of the CGRP that are able to relieve an acute headache attack, with or without aura. The mechanism of action differs between them, erenumab acts by binding to the CGRP receptor, competes with the peptide and inhibits its function at the receptor, whereas fremanezumab and galcanezumab selectively bind to the CGRP ligand and block its binding to the receptor. Adverse effects (AEs) reported include constipation, rhinitis and cardiovascular adverse reactions that should be taken into account during follow-up of patients⁽¹⁰⁾.

Risks of long-term CGRP blockade

Currently, the risks of long-term blocking of CGRP signalling are not known. The CGRP peptide acts throughout the body, therefore, circulating antibodies could affect all peripherally accessible sites where CGRP acts^(1,11).

One concern is the chronic reduction of CGRP in the vascular system, where it acts as a potent vasodilator. This could cause cardiovascular disorders such as hypertension, cardiac dysfunction and episodes of coronary or cerebral ischaemia⁽¹¹⁾. Therefore, as with any new class of drug, continued monitoring of various patient populations for risks associated with long-term treatment of CGRP-related antibodies is important⁽¹⁾.

Thus, the aim of this study is to analyse the effectiveness and safety of anti-CGRP mAbs in patients with either CM or HFEM. As well, our purpose is to analyse the effectiveness of switching between mAbs in refractory patients, as well as the concomitant use of Onabot A, which are emerging as new current clinical practice.

Methods

This observational, retrospective, multicentre study was carried out between March 2019 and April 2021 at one third level and one first level hospital. The inclusion criteria were patients treated with a CGRP monoclonal antibody (mAb) therapy (erenumab, galcanezumab or fremanezumab) for at least 3 months diagnosed of CM or HFEM. Patients in treatment with these drugs accepted to collect demographic and clinical data, confidentially, related to efficacy and safety of their treatment during pharmacy visits.

Baseline demographic and clinical characteristics were recorded from electronic medical records and prescription records. When mAb therapy is prescribed for the first time, pharmacists record patient's basal characteristic such as type of migraine diagnosed and monthly migraine days (MMDs) before initiating mAb treatment. During the next pharmacy visits, the pharmacist records any relevant adverse effect related to treatment and reasons to discontinuation. At 3, 6 and 12-month period with active treatment, monthly migraine days are recorded again (per-patient self-reported).

Clinical and safety data included: treatment received (type of CGRP mAb and dose), changes in dose or treatment during follow-up period, number of doses received until change of mAb or dose increase), total number of doses received, previous mAb treatment (yes/no), monthly migraine days (MMDs) at baseline and at 3, 6 or 12-month period (if applicable), previous treatment with Onabot A (yes/no), concomitant treatment with Onabot A (yes/no), other concomitant treatment (drug therapy group), cardiovascular adverse effects (AEs) related to mAb and other AEs.

In order to analyse the effect in change of MMDs from baseline to 3, 6 or 12 months after mAb treatment, we performed a paired Student t-test. The statistical analysis was performed with program R[®] version 3.6.2. We applied the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement in the conduct of this study.

Results

A total of 127 patients met the inclusion criteria: 86 patients treated with erenumab, 25 with galcanezumab and 16 with fremanezumab for at least 3 months. Demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1 stratified by treatment. Independently of the mAb, most patients were female (>75%) and most patients were diagnosed of CM.

Related to patients treated with erenumab, the mean age was 47 years (range, 17-69). All patients were adults except one patient with 17 years. Clinicians prescribed the lowest dose (erenumab 70 mg) at initial of treatment with CGRP mAb to 94.2 % (81/86) of patients and 55.8% (48/86) required a dose increase because of inadequate or loss of response. The mean number of doses administered until dose increase or change to other CGRP mAb was 4.4 (3-6) and the mean number of total doses administered was 8 (6-11). The 11.62% (10/86) of patients changed to a second CGRP mAb and 3.5% (3/86) changed to a third CGRP mAb, either of loss of response or adverse effects such as constipation. The median MMDs at baseline was 11.8 (9-15) and 5.1 (2-7) after 3, 6 or 12 months. We performed a paired t-Student test to evaluate this outcome and the results were statistically significant ($p < 0.01$).

The subjective perception of lower intensity of migraines was reported by 96.5% (83/86) of patients. At baseline, 83.7 % of patients had been treated with Onabot A and during the period with erenumab, 8.13 % (72/86) received concomitant treatment with Onabot A. Other drugs used were triptans (43 %), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (9.3, opioids (3.5 %), antidepressants (12.7 %), antiepileptics (8.14 %) During pharmacy visits, 3.5 % (3/86) of patients treated with erenumab reported cardiovascular (CV) adverse events: 2 patients referred chest pain and 1 patient tachycardia. Most common non-cardiovascular adverse effect reported was constipation (9.3%), intense itching (3.5%), malaise (3.5 %), insomnia (2.3 %), rhinitis (2.3 %) and headache worsening (2.3 %). More than 20% (20/86) of patients reported any of these non-CV adverse event.

Demographic results for patients treated with galcanezumab are similar with mean age of 45 years (range, 22-67) and 76 % (19/25) female patients. Only 3 patients (12%) had HFEM disease. Almost half of the patients (44%) were previously treated with other CGRP mAb (erenumab) and 6 of 25 patients needed to change to other CGRP mAb because of loss of response or intolerance. The mean number of doses administered until change of molecule was 7,5 [3,5-9,5]. The median number of MMDs at baseline was 12 (8-15) and 5 (3-6,25) after 3,6 or 12 months. Paired t-test showed statistically significant results for the difference in MMDs (p=6,8e-5). However, if we analyse in detail the results from patients previously treated with erenumab, the mean of MMDs only differs slightly from 12 days when they were treated with erenumab to 8 days after galcanezumab.

Subjective improvement in intensity of migraines was reported by 76% (19/25) of patients. Three patients (12%) had concomitant treatment with Onabot A. Other drugs prescribed were triptans (40%), antiepileptics (20%), antidepressants (16%), NSAIDs (4%) and opioids (4%). None of the patients reported any CV adverse effect, but some patients complained about end-of-dose effect (12%), constipation (4%) and headache worsening (4%).

Data for fremanezumab group is limited because of the small proportion of patients meeting the inclusion criteria. Safety and effectiveness results are not described for fremanezumab because records at pharmacy visits had not been obtained yet. Mean age is 51.8 years (range 34-71) and 81.25% (13/16) are female patients. Two patients included are diagnosed of HFEM (12.5%). Half of the cohort had been previously treated with any CGRP mAb and 100% (16/16) of the patients initiated with the lowest dose of fremanezumab (225 mg) and, until date, no one has required dose increment. Median MMDs has just been measured at baseline: 11.8 [10-14.25]. Nearly 100% (15/16) of patients were previously treated with Onabot A and 6.25% (1/16) received Onabot A combined with mAb. Other preventive and acute-treatments prescribed were triptans (50%), NSAIDs (18.75%) and opioids (12.5%). At pharmacy visits, at least half of the patients complained about lack of follow-up by reference neurologist independently of the mAb prescribed.

Table 1. Principal patients' characteristics, clinical and safety data of erenumab, galcanezumab and fremanezumab.

CHARACTERISTICS	ERENUMAB (n= 86)	GALCANEZUMAB (n= 25)	FREMANEZUMAB (n= 16)
Age, years (mean)	47 (17-69)	45 (22-67)	51.8 (34-71)
Sex (n, %)			
Female	68 (79 %)	19 (76 %)	13 (81.25 %)
Male	18 (21 %)	6 (14 %)	3 (18.75 %)
Diagnostic, type of migraine			
Chronic migraine	61 (70.9 %)	22 (88 %)	14 (87.5 %)
High frequency episodic disease	25 (29.1 %)	3 (12 %)	2 (12.5 %)
Previous CGRP mAb	No	11 (44%, erenumab)	8 (50 %)
Lowest dose at initial of treatment (n, %)	81 (94.2 %)	NA	16 (100 %)
Need of dose increase	48 (55.8 %)	NA	No

CHARACTERISTICS	ERENUMAB (n= 86)	GALCANEZUMAB (n= 25)	FREMANEZUMAB (n= 16)
Need of change to another mAb (n, %)	13 (15.11 %)	6 (24 %)	No
-Change to a second mAb (n, %)	10 (11.62 %)	6 (24 %)	
-Change to a third mAb (n, %)	3 (3.5 %)	NA	
Mean n° of doses administered until dose increase or change in treatment (IC 95%)	4.4 [3-6]	7.5 [3.5-9.5]	NA
Mean total n° of doses administered (IC 95%)	8 [6-11]	7.7 [5-10]	3.7 [3-4]
Mean n° of MMDs at baseline (IC 95%)	11.8 [9-15]	12 [8-15]	11.8 [10-14,25]
Mean n° of MMDs after mAb (3, 6 or 12 months)	5.1 [2-7]	5 [3-6.25]	-
Subjective improvement in intensity of migraines (yes/no)	83 (96.5 %)	19 (76 %)	-
Previous treatment with Onabot A (n %)	72 (83.7 %)	16 (64 %)	15 (93.75 %)
Concomitant treatment with Onabot A (n %)	7 (8.13 %)	3 (12 %)	1 (6.25 %)
Other concomitant treatment:			
-Triptans	37 (43 %)	10 (40 %)	8 (50 %)
-NSAIDs	8 (9.3 %)	1 (4 %)	3 (18.75 %)
-Opioids	3 (3.5 %)	1 (4 %)	2 (12.5 %)
-Antidepressants	11 (12.7 %)	4 (16 %)	NA
-Anti-epileptics	7 (8.14 %)	5 (20 %)	NA
CV AEs (n, %)	3 (3.5 %)	No	-
-Chest pain	2 (2.3 %)		
-Tachycardia	1 (1.16 %)		
Other AEs (n, %)	20 (23.25 %)	5 (20 %)	-
-Constipation	8 (9.3 %)	1 (4 %)	
-End-of-dose effect	NA	3 (12 %)	
-Intense itching	3 (3.5 %)	NA	
-Malaise	3 (3.5 %)	NA	
-Insomnia	2 (2.3 %)	NA	
-Rhinitis	2 (2.3 %)	NA	
-Headache worsening	2 (2.3 %)	1 (4 %)	
CGRP mAb: monoclonal antibody anti-calcitonin gene-related peptide; MMDs: monthly migraine days; NSAIDs: Non-steroidal anti-inflammatory drugs; CV: cardiovascular; AEs: adverse effects; NA: Not applicable; -: Data not available			

Discussion

In the present real-life experience, we observed a significant and similar reduction in the number of MMDs across the groups of erenumab and galcanezumab with similar results, as well, in subjective improvement in intensity of migraines reported by patients. It has been demonstrated that CGRP mAbs are a new effective preventive treatment of migraines for a huge proportion of patients that, also, indirectly, improve patients' life quality. But, an outstanding number of patients do not respond satisfactorily to these new molecules, as they are primary non-responders or they lose response after a few months^(3,12).

As reported by our colleagues Briceño-Casado et al.⁽¹²⁾ in a case of series, a notable proportion of patients changed to another mAb because of loss of response or primary no-response. Our results show that even a small proportion of patients switched to a third mAb because of inefficacy to the both previous mAb administered. Currently at clinical practice, the strategy for these patients which do not respond to a first CGRP mAb, is based on switching of CGRP mAbs, even though evidence for this practice is limited⁽¹²⁾. We observed that non-responders' patients treated with erenumab did not achieve notorious reduction y MMDs despite switching to galcanezumab. Even so, a small proportion of patients switched to fremanezumab for one last chance. Lack of evidence for switching of anti-CGRP molecules was already described in the position report of fremanezumab for the prevention of migraine by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices⁽¹³⁾. As the effectiveness of these drugs seems to be equivalent, it could be reasonable to establish the therapeutic alternative based on efficiency criteria and cost minimization strategy⁽¹⁴⁾.

In the meta-analysis performed by Briceño-Casado et al.⁽¹⁴⁾, there were also no differences between CGRP mAbs in terms of safety. In our study, CV adverse events are exclusively reported by patients treated with erenumab and not by those treated with galcanezumab. Two patients reported chest pain and one patient reported tachycardia. Although these effects were not serious, the safety profile of the molecules could be another key point in the selection of the CGRP mAb.

Blumenfeld et al.⁽³⁾, recently reported real-world evidence about concomitant treatment of CGRP mAbs and Onabotulinumtoxin A for those patient's refractory to monotherapy with CGRP mAbs. Results from our study demonstrate that this is, as well, a clinical practice starting to emerge as an option to enhance the effect of the mAb for highly refractory patients that have not respond to one or two mAb or do not achieve sufficient reduction in MMDs. It is important to point that more than 60% of patients either treated with erenumab, galcanezumab or fremanezumab had been previously treated with Onabotulinumtoxin A with loss of response after several doses. Combination of CGRP mAbs and Onabotulinumtoxin A is based on an additive effect preventing the activation of various pain fibers.

Follow-up of patients with CM or HFEM treated with CGRP mAbs is mandatory. Regulatory Agencies strongly recommend a minimum of 12 weeks since the first dose of the CGRP mAb to determine if the mAb selected is not being effective^(13,15). But, in clinical practice, we observed that some patients switched to other CGRP mAb in assumption of loss of response before this period of time. By the other hand, once the preventive treatment is well established, it is important to emphasize to the patient the importance of taking medication for acute crisis.

As well, it is essential to detect those patients that have problems with the CGRP mAb because of ineffectiveness or AEs. We observed that more than a half of patients complained at pharmacy visits of lack of follow-up by neurologist and reported problems with the medication. Follow-up by pharmacists should include patient reported outcome measures (PROMs) as the Migraine Disability Assessment test (MIDAS) or the headache impact test (HIT-6) and records of safety outcomes.

Limitations of the study

Results for the outcome number of MMDs at 3, 6 or 12 months were treated together as at the moment of cut-off some patients had been followed-up for 3 or 6 months and the rest of them for 12 months. Subgroup's analysis would have been an ideal option for the management of this outcome that could not be performed. Related to fremanezumab, there is no data for effectiveness or safety outcomes because patients had received less than 3 doses by the time of cut-off. Thus, comparisons of effectiveness and safety between the three groups were limited.

Conclusion

CGRP mAbs are similarly effective in the reduction of MMDs, but switching of mAbs in non-responders' patients might not have significant impact. Concomitant treatment of CGRP mAbs and Onabotulinumtoxin A for refractory patients is a new clinical practice that may have positive results but may be explored with caution because of limited evidence. Follow-up of patients is the best tool to ensure

the effectiveness and safety of these new molecules. Clinical pharmacists have a new field of action in the prevention and treatment of CM and HFEM to help these patients manage the burden of migraine.

References

1. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K, Krause DN. CGRP as the target of new migraine therapies - successful translation from bench to clinic. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(6):338-350. Doi: 10.1038/s41582-018-0003-1.
2. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia*. 2004;24 Suppl 1:9-160. Doi: 10.1111/j.1468-2982.2003.00824.x.
3. Blumenfeld AM, Frishberg BM, Schim JD, Iannone A, Schneider G, Yedigiarova L et al. Real-World Evidence for Control of Chronic Migraine Patients Receiving CGRP Monoclonal Antibody Therapy Added to OnabotulinumtoxinA: A Retrospective Chart Review. *Pain Ther*. 2021. Doi: 10.1007/s40122-021-00264-x.
4. Buse DC, Fanning KM, Reed ML, et al. Life with migraine: effects on relationships, career, and finances from the chronic migraine epidemiology and outcomes (CaMEO) study. *Headache*. 2019;59:1286-99. Doi: 10.1111/head.13613i
5. Bloudek LM, Stokes M, Buse DC, Wilcox TK, Lipton RB, Goadsby PJ et al. Cost of healthcare for patients with migraine in five European countries: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *J Headache Pain*. 2012;13(5):361-78. Doi: 10.1007/s10194-012-0460-7.
6. Silberstein SD, Holland S, Freitag F, Dodick DW, Argoff C, Ashman E; Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. Evidence-based guideline update: pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. *Neurology*. 2012;78(17):1337-45. Doi: 10.1212/WNL.0b013e3182535d20. Erratum in: *Neurology*. 2013;80(9):871.
7. González-Hernández A, Marichal-Cancino BA, MaassenVanDenBrink A, Villalón CM. Side effects associated with current and prospective antimigraine pharmacotherapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018;14(1):25-41. Doi: 10.1080/17425255.2018.1416097.
8. Burstein R, Blumenfeld AM, Silberstein SD, Manack Adams A, Brin MF. Mechanism of action of onabotulinumtoxinA in chronic migraine: a narrative review. *Headache*. 2020;60:1259-72
9. Food and Drug Administration. Drug innovation—novel drug approvals for 2018. [Available at: www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/druginnovation/ucm592464.htm.] Updated November 13, 2018. [Accessed; April 22, 2021]
10. Peters GL. Migraine overview and summary of current and emerging treatment options. *Am J Manag Care*. 2019;25(2 Suppl):S23-S34.
11. MaassenVanDenBrink A, Meijer J, Villalón CM, Ferrari MD. Wiping Out CGRP: Potential Cardiovascular Risks. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(9):779-788. Doi: 10.1016/j.tips.2016.06.002.
12. Briceño-Casado MDP, Gil-Sierra MD, De-La-Calle-Riaguas B. Switching of monoclonal antibodies against calcitonin gene-related peptide in chronic migraine in clinical practice: a case series. *Eur J Hosp Pharm* 14 September 2021. Doi: 10.1136/ejhpharm-2021-002946
13. Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (AEMPS). Informe de posicionamiento terapéutico de fremanezumab (Ajovy®) [Last update: 3 november 2020] Available at: https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT_11-2020-fremanezumab-Ajovy.pdf?x21801
14. Briceño Casado MDP, Fenix-Caballero S, Gil-Sierra MD, Dominguez Cantero M, Alegre-del Rey EJ. Indirect treatment comparison of anticalcitonin gene related peptide pathway antibodies in chronic migraine. *Eur J Hosp Pharm*. 2020;27(Suppl 1):A109-110.

15. European Medicines Agency (EMA). Aimovig® Assesment report. [Last update: 15 june 2021] Available at: Aimovig, INN-erenumab (europa.eu) Available at: https://ejhp.bmj.com/content/27/Suppl_1/A109.2#T1 [Accessed: 11 October 2021].

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i4.24256

Artículos originales

***Momordica charantia* extract modulates inflammatory response in human lymphocytes via suppression of TNF- α**

El extracto de *Momordica charantia* modula la respuesta inflamatoria en linfocitos humanos a través de la supresión de TNF- α

Paula Fischer¹  0000-0002-5681-3962

Gabriela Cristiane Mendes Gomes¹  0000-0002-6249-2739

Bibiana Frasson Etcheverry¹  0000-0003-1525-1622

Nathália Vieira Rios¹  0000-0002-5680-1304

Pamella Eduardha Espindola Chaves¹  0000-0002-3909-5030

Emily Clori Sotelo¹  0000-0001-7353-9611

Dyene Nascimento Campos¹  0000-0001-9460-3942

Luísa Zuravski¹  0000-0003-4935-665X

Taiane Acunha Escobar¹  0000-0001-8896-3271

Michel Mansur Machado¹  0000-0002-7583-9332

¹GIGA - Grupo de Pesquisa em Imunologia e Genética Aplicada, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Brasil.

Correspondence

Michel Mansur Machado, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiiana, BR 472, Km 585, Uruguaiiana, RS, Brasil, CEP: 97500-970.
michelmachado@unipampa.edu.br

Recibido: 22.03.2022

Aceptado: 08.07.2022

Publicado: 28.09.2022

Funding

No funding

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Resumen

Introducción: *Momordica charantia* L. es ampliamente utilizada para consumo y medicina tradicional debido a sus actividades biológicas. Sin embargo, se sabe poco sobre los efectos del melón amargo en las células sanas. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar los efectos del extracto de *Momordica charantia* en linfocitos humanos aislados, especialmente en aspectos inflamatorios, citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos.

Método: Para ello se preparó un extracto hidroetanólico con frutos y semillas y se procedió a la identificación y cuantificación fitoquímica. Los linfocitos humanos purificados se expusieron a 12,5; 25; 50 µg/mL de extracto de *Momordica charantia* durante 24 horas y después de este período.

Resultados: Los datos mostraron que el extracto de *Momordica charantia* no indujo citotoxicidad, alteraciones en la frecuencia de micronúcleos, ni actividad de interleucina-6, interleucina-10 ciclooxigenasa-2 y producción de óxido nítrico; sin embargo, causó daño en el ADN y una disminución de TNF-α en las condiciones experimentales y células aplicadas.

Conclusiones: Nuestros datos proponen un proceso antiinflamatorio generado por *Momordica charantia* mediado por la reducción de TNF-α.

Palabras clave: Melón amargo; citotoxicidad; genotoxicidad; mutagenicidad; parámetros inflamatorios.

Abstract

Introduction: *Momordica charantia* L. is widely used for consumption and traditional medicine due to its biological activities. Nevertheless, little is known about the effects of bitter melon on healthy cells. Hence, we aimed to evaluate the effects of *Momordica charantia* extract in human isolated lymphocytes, especially on inflammatory, cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity aspects.

Method: For this, we prepared a hydroethanolic extract with fruits and seeds and proceeded with phytochemical identification and quantification. The human purified lymphocytes were exposed to 12.5, 25, and 50 µg/mL of *Momordica charantia* extract for 24h and, after this period.

Results: The data showed that the *Momordica charantia* extract did not induce cytotoxicity, micronucleus frequency alterations, or interleukin-6, interleukin-10 cyclooxygenase-2 activity and the production of nitric oxide; however, it caused DNA damage and a decrease of TNF-α under the experimental conditions and cells applied.

Conclusions: Our data propose an anti-inflammatory process generated by *Momordica charantia* mediated by TNF-α reduction.

Keywords: Bitter melon; cytotoxicity; genotoxicity; mutagenicity; inflammatory parameters.

Highlights

Momordica charantia L. is widely used in traditional medicine.

Momordica charantia L. act as anti-inflammatory.

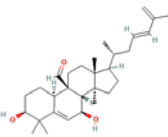
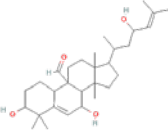
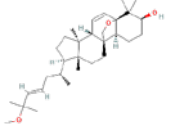
Momordica charantia L. decrease of TNF- α

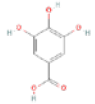
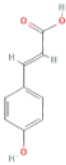
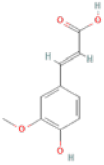
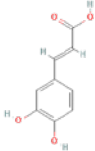
Introduction

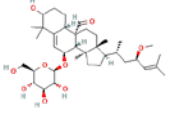
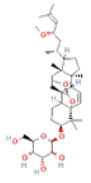
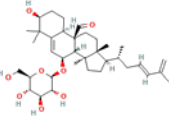




Momordica charantia L. belongs to the Cucurbitaceae family and is known popularly as bitter gourd, bitter melon, kugua, or balsam pear⁽¹⁾. The plant grows in tropical and subtropical regions, and especially the fruits and seeds are destined for therapeutic purposes⁽²⁾.

The several bioactive compounds of *M. charantia* have been recorded in the literature; they are classified as carbohydrates, proteins, lipids, triterpenoids, saponins, polypeptides, flavonoids, alkaloids, sterols and they have been used to treat various diseases and conditions since ancient times, such as cancer, asthma, bacterial, fungal and parasites infections, rheumatism, metabolic disorders and others, as can be seen in Table 1^(1,3-5). As reported, *M. charantia* possesses various pharmacological activities already described, but there are also adverse effects associated to its use (hypoglycemic coma in children, abortion or even death in laboratory animals) that have been reported in the past years and which limit its wider application⁽⁶⁾.

Table 1. Main compounds already of *Momordica charantia* in literature.

Classification	Compound	Structure	Reference
Cucurbitane type triterpenoids	Kuguacin J		Bortolotti et al., 2019
	Momordicine I		
	5,19-Epoxy-25-methoxycucurbita-6,23-dien-3-ol		

Classification	Compound	Structure	Reference
Phenolic and flavonoids	Gallic acid		Haque et al., 2011
	P-cumaric acid		
	Ferulic acid		
	Caffeic acid		

Classification	Compound	Structure	Reference
Triterpenoids glycosides	Charantagenin D		Dandawate et al., 2016
	Charantagenin E		
	Kuguaglycoside C		
Essential oils	α -pinene		Dandawate et al., 2016
	β -pinene		
	carvone		
	germacrene D		

The use of plants for therapeutic purposes is an old practice and is still very recurrent. Given the wide use and adverse effects related to *M. charantia*, it is of great importance to prove their safety. Very studies have analyzed the pharmacological action and adverse effects of *M. charantia* in different experimental models, however, they proposed high concentrations, so it becomes necessary to investigate if these effects happen even in lower concentrations and healthy conditions. However, they proposed

high concentrations, so it becomes necessary to investigate if these effects happen even in lower concentrations and healthy conditions.

In this regard, the present study mainly aimed to evaluate the effects of *Momordica charantia* L. extract on human lymphocytes, especially on inflammatory, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic aspects.

Methods

Chemicals

The reagents used in this study, sterile Histopaque® 1.077 g/mL, RPMI 1640 modified with 20 mM HEPES and L-glutamine, inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), Phytohemagglutinin-M (PHA-M), Lipopolysaccharide (LPS), penicillin/streptomycin, gentamicin solution, quercetin, kaempferol, and rutin were acquired from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). The *Momordica charantia* L. plant used in this study was obtained from a local market in March 2015 (Cunha Porã, SC, BRA). Analytical grade chemicals, such as methanol, gallic acid, acetic acid, chlorogenic acid, and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, HE, DEU).

Preparation of plant extract

The fruits and seeds of *Momordica charantia* L. were triturated and macerated in a hydroalcoholic solution at a concentration of 20 g per 100 mL of solvent at 25°C for one week under daily shaking. This maceration process was repeated for three more weeks to exhaust the material. After this period, the crude extract was filtered and evaporated to dryness with a rotary evaporator to remove ethanol and water. Thus, we obtained the dry extract of *Momordica charantia* L. (MCE), used in the subsequent tests.

Chromatography

The high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed using a Shimadzu Prominence Auto Sampler SIL-20A HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector, and the data were recorded with LC solution 1.22 SP1 software. Under gradient conditions, the reverse-phase was carried out using a C18 column, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm. The mobile phase used was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the gradient conditions consisting in 5% of B until 2min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, and 100% B at 10, 20, 40, 50 and 80min respectively, as described by Laghari⁽⁷⁾ with slight alterations. We analyzed the presence of six antioxidant compounds, namely, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, rutin, and kaempferol, by comparing retention time and UV absorption spectrum with their respective standards. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume was 40 µL, and detection wavelength was 254 nm for gallic acid, 327 nm for caffeic and chlorogenic acid, and 365 nm for quercetin rutin and kaempferol. The samples and mobile phase were filtered through a 0.45 µL membrane filter (Millipore) and subsequently degassed by ultrasonic bath previously to use. Calibration curves were built using known standard compounds for quantitative measurement of different compounds in the extracts. All the analyses were carried out in triplicate and room temperature.

Ethical aspects

The Ethics Committee approved this Federal University of Pampa study under protocol number 27045614.0.0000.5323. All the volunteers signed the free and informed consent terms (TCLE).

Lymphocytes isolation

Initially, we collected peripheral blood from seven healthy self-declared volunteers following the Organization for Economic Cooperation and Development guidelines⁽⁸⁾. We used Histopaque-1077® (2:1) to separate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC), which were transferred to a culture flask containing medium RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (v/v), and 0.2%

gentamicin (v/v) and maintained in an environment at 37°C and 5% CO₂ for 24h. After this period, we isolated the lymphocytes and stimulated them by adding PHA-M (1 mg/mL) for further experiments. Lymphocyte density was adjusted for each protocol and performed in triplicate.

Treatment schedule

The MCE was dissolved in RPMI 1640 with DMSO 3% (v/v) to final concentrations of 12.5, 25, and 50 µg/mL just before use. The concentrations selection was based on preliminary tests carried out in our laboratory (*data not shown*). Each concentration was tested, and the control groups included three replicates, analyzed after 24h of exposure to MCE. The negative control (NC) consisted of medium and DMSO 3%. The positive control (PC) contained medium and LPS (100 µg/mL) for the inflammatory parameters, and the other analyses, medium and 10 µM H₂O₂.

Lymphocytes viability

Lymphocytes were cultivated in sterile 24-well plates to a density of 1 x 10⁵ cells/well and were exposed to previously described concentrations of MCE for 24h. Lymphocyte viability was assessed by the Trypan blue dye exclusion method based on cell membrane integrity; unviable cells do not have the intact membrane, thus uptake the dye and show blue staining^(9,10). Cell viability was expressed as the percentage of viable cells.

Micronucleus assay

Mutagenicity was evaluated using the micronucleus assay accomplished according to Schmid⁽¹¹⁾. In this test, lymphocytes were seeded in sterile 24-well plates at a density of 1 x 10⁵ cells/well and exposed to previously mentioned concentrations of MCE for 24h. Subsequently, an aliquot of each culture was collected to prepare the slides, which were fixed with PA methanol, stained with methyl acid orange, Giemsa-basic (Laborclin), and dried at room temperature. Then, using an optical microscope (Olympus CX21 Led) with 1000x magnification, 500 cells per slide were analyzed and scored according to the presence or absence of micronuclei. The results were expressed as a percentage of cells with micronuclei.

Comet assay

Genotoxicity was assessed utilizing the comet assay and realized according to Singh et al⁽¹²⁾ and Tice et al⁽¹³⁾. Lymphocytes were cultivated in sterile 24-well plates at a density of 5 x 10⁴ cells/well and exposed to earlier selected concentrations of MCE for 24h. Afterward, an aliquot of each culture was homogenized with low melting point agarose 0.75% (w/v) and distributed on slide pregelatinized with normal melting point agarose and then covered with a coverslip up until solidification. The slides were immersed into a cold lysis solution (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10.0 and Triton X-100 1% with 10% of DMSO) for 24h. In sequence, electrophoresis was carried out (25 V; 300 mA) in 300 mM NaOH/ 1 mM EDTA buffer, pH > 13 for 20 min, inducing an alkaline denaturation. Then, the slides were subjected to the neutralizing solution, fixed, and stained with silver nitrate solution. The nucleoids were evaluated under an optical microscope at 400 × magnification and ranked in scores of 0 (no migration of DNA) to 4 (maximum migration of DNA) according to the damage levels; 100 nucleoids were counted in all slides. The DNA damage index can vary from 0 (all nucleoids with no migration) to 400 (all nucleoids with maximum migration of DNA).

Inflammatory parameters

The lymphocytes (5 x 10⁴ cells/well) were seeded in sterile 24-well plates and exposed to previously described concentrations of MCE. Except for the negative control, all the cultures also received LPS (100 µg/ mL) and were incubated for 24h. After this period, the inflammatory parameters, interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), cyclooxygenase-2 (COX-2) activity, Tumoral Necrosis Factor-α (TNF-α), and Nitric Oxide (NO) were measured using ELISA kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm standard deviation and performed all analyses using specific statistical software. The comparisons between groups were realized using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's *posthoc* test. The results were considered statistically significant for $p < 0.05$.

Results

Chromatography

The quantification of previously selected antioxidant compounds showed that quercetin (21.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gallic acid (15.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kaempferol (13.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and chlorogenic acid (12.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were the most constituents present in MCE (Table 2).

Table 2. Quantification of active principles in MCE.

Active principle	Concentration in the sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Dry weight of the sample (mg/mL)	Active principle concentration in the extract ($\mu\text{g}/\text{g}$ of the plant)
Quercetin	21.75	22.3	975.22
Gallic Acid	15.11		677.73
Kaempferol	13.46		603.77
Chlorogenic Acid	12.26		549.79
Caffeic Acid	8.75		392.26
Rutine	8.34		373.94

Lymphocytes viability

None of the concentrations of MCE investigated in our study affected lymphocytes viability (Figure 1a), which was about 98% in all concentrations of MCE evaluated.

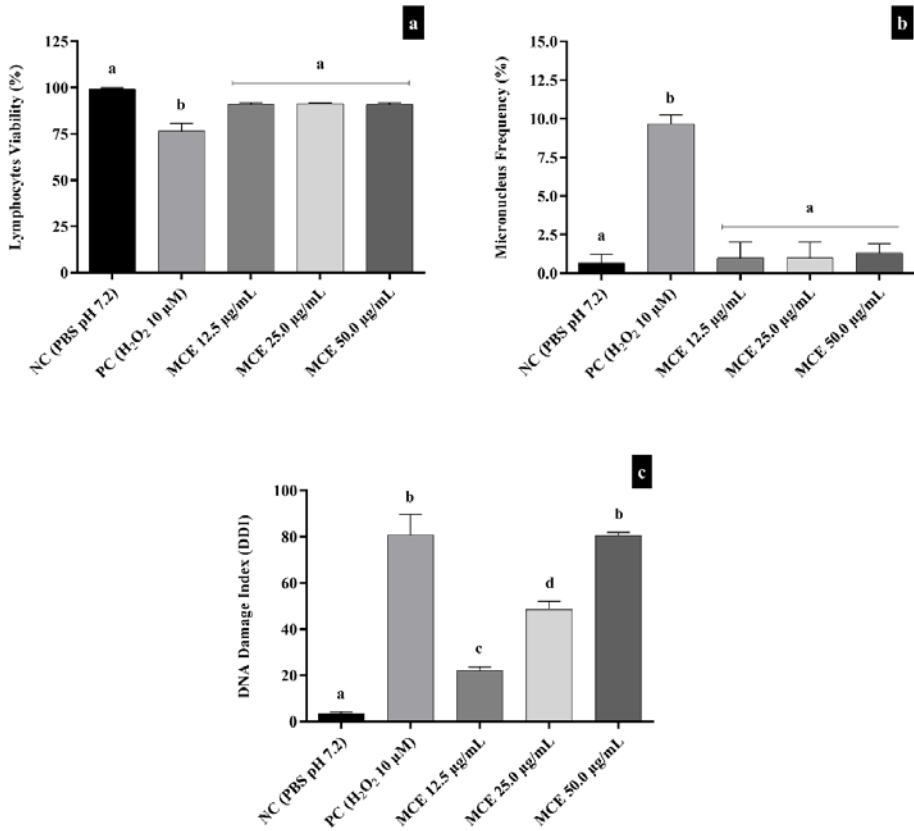


Figure 1. Lymphocyte's viability (1a), micronucleus frequency (1b) and DNA damage index (1c) in human lymphocytes exposed to different concentrations of MCE. Data are expressed as mean \pm standard deviation, n=3, performed in triplicates and analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's post hoc. We considered significant results with $p < 0.05$. Different letters mean statistically different values. NC = Negative Control; PC = Positive control (H₂O₂ 10 μ M).

Micronucleus assay

The results demonstrated that MCE did not increase micronucleus frequency in lymphocytes compared to the negative control in the tested concentrations (Figure 1b).

Comet assay

The comet assay data showed that MCE induced DNA damage concentration-dependent than the negative control group (Figure 1c).

Inflammatory parameters

Our results showed that the tested concentrations of MCE did not affect the production of IL-6 (Figure 2a), IL-10 (Figure 2b), COX-2 activity (Figure 2c), and production of NO (Figure 2d). On the other hand, MCE caused a reduction of TNF- α (Figure 2e) under the experimental conditions in the concentrations of 25 μ g/ml and 50 μ g/mL concerning the negative control group.

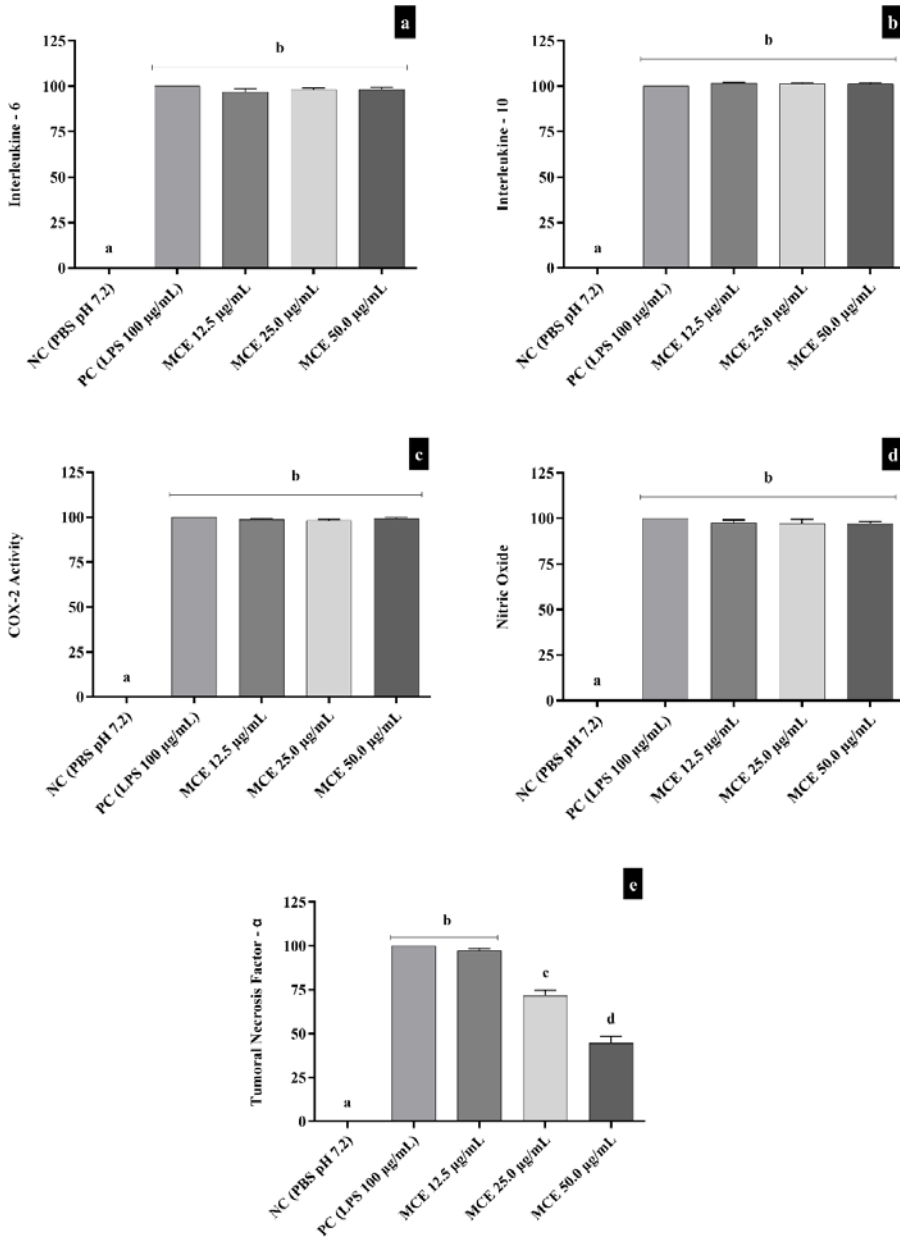


Figure 2, Effect of MCE on IL-6 (2a), IL-10 (2b), COX-2 activity (2c), Nitric Oxide (2d) and TNF-α (2e). Data are expressed as mean ± standard deviation, n=3, performed in triplicates and analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's post hoc. We considered significant results with p<0.05. Different letters mean statistically different values. NC = Negative Control; PC = Positive Control (LPS 100 µg/mL).

Discussion

Bitter melon is a climber classified as monoecious, belonging to the *Cucurbitaceae* family, commonly used for food consumption⁽¹⁴⁾. Due to the biological properties attributed to the plant, *M. charantia* also receives several uses in traditional medicine, and studies have investigated a variety of activities, which are related to phytochemical composition^(14,15). In our study, we identified the presence of six antioxidant constituents in the plant extract, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, rutin, and kaempferol, most compounds. The gallic and caffeic acid⁽¹⁶⁾ and chlorogenic acid⁽¹⁷⁾ have already been described in the *M. charantia* composition, varying only in concentrations. The amount of quercetin found in the MCE sample also was reported in other studies. The work of Pereira⁽¹⁸⁾ related that quercetin was the main flavonoid found and Supe et al⁽¹⁹⁾ demonstrated that the concentration of quercetin was between 0.05 to 0.2% in the analyzed sample. Sathasivam et al⁽²⁰⁾ also found kaempferol in high amounts in the fruit extract of MCE, corroborating our findings.

In our study, MCE did not affect lymphocytes viability which corroborates with other authors⁽²¹⁾, who found that MCE was not cytotoxic against primary epithelial cells even after 5 days of exposure.

Agrawal et al⁽²²⁾ demonstrated that a single administration of MCE at doses of 500, 1000, and 1500 mg/kg of body weight 24h before the administration of cyclophosphamide expressively prevented the formation of micronucleus in mouse bone marrow cells, which agrees with our findings that showed MCE did not affect the frequency of micronucleus under the tested conditions. Other studies have shown that aqueous extract of *M. charantia* and methanolic extract of the plant's leaves have anti-mutagenic activities^(23,24).

Our findings show that MCE induced DNA damage in a concentration-dependent manner; this damage is identified by a kind of tail like a comet formed by the DNA fragments.

Lii et al⁽²⁵⁾ found that MCE induced DNA damage in four human cancer cell lines, Hone-1 nasopharyngeal carcinoma cells, AGS gastric adenocarcinoma cells, HCT-116 colorectal carcinoma cells, and adenocarcinoma cells of CL1-0 lung at concentrations between 0.25 to 0.35 mg/mL in exposition up to 24h. Nevertheless, Ganguly⁽²⁶⁾ reported a reduction of DNA damage in circulating lymphocytes of normal mice and in a mouse skin papilloma induced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) administration following the oral administration of 100 μ L and 50 μ L of *M. charantia* aqueous extract daily for 3 months. Corroborating with our results, Li⁽²⁷⁾ data suggests a potential antitumoral activity of MCE. However, Ganguly⁽²⁶⁾ results showed a decrease in DNA damage, and this discrepancy can be explained by the different experimental models and time of exposure to *M. charantia*.

Our results of inflammatory parameters showed that IL-6 production was not affected by MCE. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine readily produced in cases of infections and tissue injuries⁽²⁸⁾. Cao⁽²⁹⁾ demonstrated that cucurbitane-type triterpenoids compounds isolated from the fruit of *M. charantia* with IC₅₀ values of 0.028 to 1.962 μ M could inhibit the production of IL-6 in LPS-stimulated bone marrow-derived dendritic cells, and the authors attributed these effects to interactions of hydrogen bonds between the protein residues and hydroxyl groups and sugar rings of triterpenoids compounds, which were visualized by molecular docking. Another study showed that the expression of IL-6 in adipose tissues and brown adipose tissues of diet-induced obese mice was lower in animals fed with the fruit of *M. charantia* in the concentrations of 2% and 5%⁽³⁰⁾, the authors associated these results to the improvement of insulin resistance and fat deposition in the rodent model. It is noteworthy that IL-6 is associated with adipose tissue inflammation related to insulin resistance. IL-10 is a regulatory cytokine that possesses anti-inflammatory properties⁽³¹⁾. Fachinan⁽³¹⁾ showed the protective anti-inflammatory effects of *M. charantia* in a study with diabetic rats treated with *M. charantia* fruit juice (10 mL/kg body weight) for 28 consecutive days. In addition, Ünal⁽³²⁾ also reported an increase of IL-10 in rats with colitis induced experimentally with 300 mg (kg/day) of MCE for 6 weeks orally. Our results showed that MCE did not affect the production of IL-10 in isolated human lymphocytes; this discrepancy could probably be due to the experimental model, different times of exposure, and concentrations of MCE.

In our study, there was no alteration in COX-2 activity; already Chao⁽³³⁾ observed a decrease of COX-2 enzyme expression levels in rats with induced sepsis and treated for 4 weeks with 4 g daily of a test

feed containing 10% of MCE lyophilized powder. Ali⁽³⁴⁾ also observed a reduction in an animal model of hepatocarcinogenesis in which the rats were treated with *M. charantia* methanol extract (40 mg/kg body weight) for 30 days. Additionally, Yang, Yang (35) identified inhibition of COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 with inflammatory process induced by LPS (1 µg/mL) for 24h and pre-incubated with *M. charantia* methanol extract (100 and 200 µg/mL) for 30min. Differences in the cell lines can explain these divergences, treatment protocols applied, and since cells with high inflammatory status have a more significant response to the compounds with potential anti-inflammatory effects present in the MCE than regular cell lines.

We observed that MCE did not induce alterations in the production of NO, opposite to Li⁽³⁵⁾, which described inhibition of NO production in mouse macrophage-like cell line RAW 264.7 with inflammation induced by LPS and exposed to different *M. charantia* fruit extracts for 24h, being that 50 µg/mL ethanolic extract which presented the most NO levels decrease. This discrepancy can be related to the cell line, time of exposure, and the LPS concentration selected for inflammation induction (1 µg/mL) lower than the concentration applied in our study. Dwijayanti⁽³⁶⁾ also reported a reduction of NO in a dose-dependent manner in rats hepatocytes treated with interleukin-1β (IL-1β) and *M. charantia* methanol extracts (50 µg/mL, 100 µg/mL and 200 µg/mL) for 8h. These variations may be associated with cell lines, exposure time to MCE, and especially to the IL-1β inflammation induction therapy⁽³⁷⁾.

In our study, we also observed that MCE was able to reduce TNF-α levels, which is in agreement with results found by Lee⁽³⁸⁾, who demonstrated that MCE could dose-dependently reduce the production of TNF-α in RAW 264.7 murine macrophages treated with a concentration of 12.5% v/v (5 mg/ mL of soluble MCE) for 4h. Cheng⁽³⁹⁾ also observed this reduction in FL83B cells with induced inflammation by TNF-α and treated for 24h with a mixture containing the triterpene isolated from *M. charantia*.

In conclusion, we demonstrated in our study that quercetin, gallic acid, kaempferol, and chlorogenic acid were the primary compounds found in MCE analyzed. The MCE did not induce cytotoxicity, alteration of micronucleus frequency, or interference in the production of IL-6, production of IL-10, COX-2 activity, and NO production, but caused DNA damage and a decrease of TNF-α in purified human lymphocytes exposed to MCE for 24h. For that reason, we suggest that MCE modulates inflammatory response in human lymphocytes via suppression of TNF-α. The applications of MCE were related to its use as a possible nutraceutical in the future, evaluating the safety of its use. In the literature, adverse effects associated with its use have been reported in recent years limiting its applications⁽⁶⁾, however, these studies used high concentrations of MCE. Therefore, we proposed exposure to lower concentrations and healthy conditions, with the intention of observing whether these effects persist even in these circumstances. Although studies have reported biological activities of MCE and among them the anti-inflammatory, our research proposed a mechanism through which the MCE could modulate the inflammatory response in human lymphocytes.

Acknowledgment

National Council for Scientific and Technological Development and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) supported this study.

References

1. Jia S, Shen M, Zhang F, Xie J. Recent advances in *Momordica charantia*: functional components and biological activities. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2555. Doi: 10.3390/ijms18122555.
2. Anilakumar KR, Kumar GP, Ilaiyaraja N. Nutritional, pharmacological and medicinal properties of *Momordica charantia*. *International J Nut Food Sci*. 2015;4(1):75-83. doi: 10.11648/j.ijnfs.20150401.21
3. Grover J, Yadav S. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol*. 2004;93(1):123-32. Doi: 10.1016/j.jep.2004.03.035

4. Kumar KS, Bhowmik D. Traditional medicinal uses and therapeutic benefits of *Momordica charantia* Linn. *Int J Phar Sci Rev Res*. 2010;4(3):23-8. ISSN 0976 – 044X
5. Bortolotti M, Mercatelli D, Polito L. *Momordica charantia*, a nutraceutical approach for inflammatory related diseases. *Front Pharmacol*. 2019;10:486. Doi: 10.3389/fphar.2019.00486
6. Kwatra D, Dandawate P, Padhye S, Anant S. Bitter melon as a therapy for diabetes, inflammation, and cancer: a panacea? *Curr Pharmacol Rep*. 2016;2(1):34-44. Doi: 10.1007/s40495-016-0045-2
7. Laghari AH, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem*. 2011;126(4):1850-5. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.165
8. Co-operation OfE, Development. Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test: OECD Publishing; 2016.
9. de Moura Leão MF, Duarte JA, Sauzen PD, Piccoli JdCE, de Oliveira LFS, Machado MM. Cytotoxic and genotoxic effects of antihypertensives distributed in Brazil by social programs: Are they safe? *Environ Toxicol Pharmacol*.. 2018;63:1-5. Doi: 10.1016/j.etap.2018.08.005
10. Pasqualli T, E Chaves PE, da Veiga Pereira L, Adílio Serpa É, de Oliveira LFS, Machado MMJC, et al. Sucralose causes non-selective CD4 and CD8 lymphotoxicity via probable regulation of the MAPK8/APTX/EID1 genes: An in vitro/in silico study. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2020;47(10):1751-7. Doi: 10.1111/1440-1681.13362
11. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res Environ Mutagen Relat Subj*. 1975;31(1):9-15. Doi: 10.1007/978-1-4684-0892-8_2
12. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91. Doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
13. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21. Doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
14. Dandawate PR, Subramaniam D, Padhye SB, Anant S. Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chin J Nat Med*. 2016;14(2):81-100. Doi: 10.1016/S1875-5364(16)60002-X
15. Zhang F, Lin L, Xie J. A mini-review of chemical and biological properties of polysaccharides from *Momordica charantia*. *Int J Biol Macromol*. 2016;92:246-53. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.101
16. Kubola J, Siriamornpun S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chem*. 2008;110(4):881-90. Doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.076
17. Horax R, Hettiarachchy N, Chen P. Extraction, quantification, and antioxidant activities of phenolics from pericarp and seeds of bitter melons (*Momordica charantia*) harvested at three maturity stages (immature, mature, and ripe). *J Agric Food Chem*. 2010;58(7):4428-33. Doi: 10.1021/jf9029578
18. Pereira CA, Oliveira LL, Coaglio AL, Santos FS, Cezar RS, Mendes T, et al. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation in vitro. *Vet parasitol*. 2016;228:160-6. Doi:10.1016/j.vetpar.2016.08.025
19. Supe U, Daniel P. Preliminary phytochemical analysis and quantitative analysis of Quercetin by HPLC of *Momordica charantia*. *World J Pharm Res*. 2014;4(01):848-53. ISSN 2277– 7105
20. Sathasivam R, Park CH, Yeo HJ, Park YE, Kim JK, Park SU. Analysis of triterpenoids, carotenoids, and phenylpropanoids in the flowers, leaves, roots, and stems of white bitter melon (*Cucurbitaceae*, *Momordica charantia*). *Trop J Pharm Res*. 2021;20(1):155-60. Doi: 10.4314/tjpr.v20i1.22
21. Ray RB, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. *Cancer Res*. 2010;70(5):1925-31. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3438

- 22.** Agrawal R, Beohar T. Chemopreventive and anticarcinogenic effects of *Momordica charantia* extract. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2010;11(2):371-5. ISSN 1513-7368.
- 23.** Birla D, Sonali K, Shaikh A, Khan A, Ghosi A, Pardeshi P. Evaluation of antimutagenic activity of methanolic extract of leaves of *Momordica charantia* Linn. *Int J Health Med.* 2017;5:81-3. ISSN: 2321-2187
- 24.** Sumanth M, Chowdary GN. Antimutagenic activity of aqueous extract of *Momordica charantia*. *Int J of Biotechnol and Mol Bio Res.* 2010;1(4):42-6. ISSN 2141-2154
- 25.** Lii C-K, Chen H-W, Yun W-T, Liu K-L. Suppressive effects of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *J of Ethnopharmacol.* 2009;122(2):227-33. Doi: 10.1016/j.jep.2009.01.028
- 26.** Ganguly C, De S, Das S. Prevention of carcinogen-induced mouse skin papilloma by whole fruit aqueous extract of *Momordica charantia*. *Eur J of Cancer Prev.* 2000:283-8. Doi: 10.1097/00008469-200008000-00009
- 27.** Li C-J, Tsang S-F, Tsai C-H, Tsai H-Y, Chyuan J-H, Hsu H-Y. *Momordica charantia* extract induces apoptosis in human cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Evid Based Complem and Altern Med.* 2012;2012. Doi:10.1155/2012/261971
- 28.** Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295. Doi: 10.1101/cshperspect.a016295
- 29.** Cao TQ, Phong NV, Kim JH, Gao D, Anh HLT, Ngo V-D, et al. Inhibitory Effects of Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia* Fruit on Lipopolysaccharide-Stimulated Pro-Inflammatory Cytokine Production in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Molecules.* 2021;26(15):4444. Doi: 10.3390/molecules26154444
- 30.** Bao B, Chen Y-G, Zhang L, Na Xu YL, Wang X, Liu J, et al. *Momordica charantia* (Bitter Melon) reduces obesity-associated macrophage and mast cell infiltration as well as inflammatory cytokine expression in adipose tissues. *PloS one.* 2013;8(12):e84075. Doi: 10.1371/journal.pone.0084075
- 31.** Fachinan R, Yessoufou A, Nekoua MP, Moutairou K. Effectiveness of antihyperglycemic effect of *Momordica charantia*: implication of t-cell cytokines. *Evid Based Complem and Altern Med.* 2017;2017. Doi: 10.1155/2017/3707046
- 32.** Ünal NG, Kozak A, Karakaya S, Oruç N, Barutçuoğlu B, Aktan Ç, et al. Anti-inflammatory effect of crude *Momordica charantia* l. extract on 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis model in rat and the bioaccessibility of its carotenoid content. *J Med Food.* 2020;23(6):641-8. Doi: 10.1089/jmf.2019.0124
- 33.** Chao C-Y, Sung P-J, Wang W-H, Kuo Y-H. Anti-inflammatory effect of *Momordica charantia* in sepsis mice. *Molecules.* 2014;19(8):12777-88. Doi: 10.3390/molecules190812777
- 34.** Ali MM, Borai IH, Ghanem HM, Abdel-Halim AH, Mousa FM. The prophylactic and therapeutic effects of *Momordica charantia* methanol extract through controlling different hallmarks of the hepatocarcinogenesis. *Biomed & Pharmacother.* 2018;98:491-8. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.096
- 35.** Yang WS, Yang E, Kim M-J, Jeong D, Yoon DH, Sung G-H, et al. *Momordica charantia* inhibits inflammatory responses in murine macrophages via suppression of TAK1. *Am J Chin Med.* 2018;46(02):435-52. Doi: 10.1142/S0192415X18500222
- 36.** Dwijayanti DR, Okuyama T, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (*Momordica charantia* L.) fruit extracts on interleukin-1 β -treated hepatocytes. *Funct Foods in Health and Dis.* 2019;9(1):16-33. Doi: 10.31989/ffhd.v9i1.560
- 37.** Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Res.* 2013;62(7):641-51. Doi: 10.1007/s00011-013-0633-0

38. Lee SY, Wong WF, Dong J, Cheng K-K. Momordica charantia suppresses inflammation and glycolysis in lipopolysaccharide-activated RAW264. 7 macrophages. *Molecules*. 2020;25(17):3783. Doi: 10.3390/molecules25173783

39. Cheng H-L, Kuo C-Y, Liao Y-W, Lin C-C. EMCD, a hypoglycemic triterpene isolated from Momordica charantia wild variant, attenuates TNF- α -induced inflammation in FL83B cells in an AMP-activated protein kinase-independent manner. *Eur J Pharmacol*. 2012;689(1-3):241-8. Doi: 10.1016/j.ejphar.2012.05.033

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i4.25982

Artículos originales

Quitosano de Cangrejos con actividad antimicrobiana en compotas artesanales de plátanos

Crab chitosan with antimicrobial activity in artisanal banana compotes

Jenny Huerta León¹  0000-0003-4744-7830

Jhonnell Samaniego Joaquin¹  0000-0002-0033-7119

David Puma Quispe¹  0000-0001-8647-9152

Jovana Soria Quispe¹  0000-0001-7921-0104

¹Universidad María Auxiliadora, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Lima, Perú.

Correspondencia

Jenny Huerta León
jenny.huerta@uma.edu.pe

Recibido: 14.08.2022

Aceptado: 14.09.2022

Publicado: 28.09.2022

Financiación

Propia

Conflicto de intereses

Ninguno

Resumen

Introducción: La importancia del quitosano se debe a sus propiedades químicas y biológicas ya que es biodegradable, bioactivo, poli catiónico y biocompatible, lo que le confiere una gran utilidad en la industria en aspectos biomédicos. La efectividad de sus derivados tales como la carboximetilquitosano está comprobada debido a que presenta propiedades como el ser soluble en agua y actuar como antimicrobiano en el algodón usado en la industria textil. El quitosano se extrae a partir de la quitina de los desechos de los crustáceos, siendo este polisacárido el segundo más abundante en la Naturaleza.

Método: El presente estudio es de tipo aplicado con diseño y nivel experimental de corte transversal. Se utilizó, por un lado, dos variedades de plátanos: plátano isla (*Musa paradisiaca*) y plátano pildorita (*Musa alinsanaya*); de otro lado, se usaron cangrejos procedentes de los Manglares de Tumbes. La muestra no probabilística fue de 10 compotas de cada tipo de plátano y una solución de quitosano al 80% (p/v). La técnica microbiológica utilizada para el análisis de hongos y levaduras fue el recuento en placa. Se consideró evaluar el efecto conservante del quitosano respecto al del benzoato sódico.

Resultados: En las muestras tratadas con quitosano (80% p/v), un 60% de ellas mostró ausencia de crecimiento y un 40% crecimientos de 5 UFC/g. Por otro lado, en las muestras tratadas con benzoato de sodio (0,1% p/v) no hubo crecimiento bacteriano en el 80% de los casos y sólo en un 20% hubo crecimientos de 10 UFC/g.

Conclusiones: el quitosano obtenido a partir de la quitina de cangrejo tiene efecto antimicrobiano sobre hongos y levaduras, cuando se utiliza en una proporción del 80% (p/v) en compotas procesadas de plátano peruano.

Palabras clave: quitosano; crecimiento bacteriano; plátano.

Abstract

Introduction: The importance of chitosan is due to its chemical and biological properties as it is biodegradable, bioactive, poly cationic and biocompatible, which gives it great utility in the industry in biomedical aspects. The effectiveness of its derivatives such as carboxymethylchitosan is proven due to its water-soluble and antimicrobial properties in cotton used in the textile industry. Chitosan is extracted from the chitin of crustacean waste, the second most abundant polysaccharide in nature.

Method: This is an applied study with a cross-sectional design and experimental level. Two varieties of plantain were used: island plantain (*Musa paradisiaca*) and pildorita plantain (*Musa alinsanaya*); on the other hand, crabs from the Tumbes mangroves were used. The non-probabilistic sample consisted of 10 compotes of each type of plantain and an 80% (w/v) chitosan solution. The microbiological technique used for the analysis of fungi and yeasts was the plate count. It was considered to evaluate the preservative effect of chitosan with respect to that of sodium benzoate.

Results: In the samples treated with chitosan (80% w/v), 60% of them showed no growth and 40% showed growths of 5 CFU/g. On the other hand, in the samples treated with sodium benzoate (0.1%) there was no bacterial growth in 80% of the cases and only in 20% there were growths of 10 CFU/g.

Conclusions: Chitosan obtained from crab chitin has an antimicrobial effect on fungi and yeasts, when used at a rate of 80% (w/v) in processed Peruvian plantain compotes.

Keywords: Chitosan; Bacterial Growth; Musa.

Puntos clave

La industria pesquera del departamento de Tumbes produce gran cantidad de residuos de crustáceos, siendo estos desechos la materia prima, que permite industrializar la quitina. En primer lugar, se aísla la proteína de los minerales, generalmente calcáreos y otros pigmentos. El quitosano es un derivado de la quitina y se obtiene por industrialización mediante tratamiento de desacetilación química o enzimática.

Introducción

El quitosano tiene transcendencia por sus propiedades químicas y biológicas debido a que es biodegradable, bioactivo, poli-catiónico y biocompatible⁽¹⁾; gracias a estas propiedades es muy utilizado en la industria biomédica. Se ha comprobado que derivados del quitosano como el carboximetilquitosano soluble en agua puede actuar como antimicrobiano en el algodón en la industria textil. El quitosano se extrae a partir de la quitina obtenida de los desechos de los crustáceos, siendo el segundo polisacárido más abundante en la Naturaleza.

En la industria alimentaria el quitosano se usa como aditivo (espesantes, gelificantes y emulsificantes)⁽²⁾, también como un clarificador en la industria de bebidas tales como el agua, el vino y el zumo de manzana, presentando la ventaja de que no afecta al color de las bebidas.

En la industria pesquera, como por ejemplo en el departamento de Tumbes, se generan residuos de crustáceos⁽³⁾; estos desechos sirven como materia prima para industrializar la quitina. Una de las etapas en este procedimiento consiste en aislar primero la proteína, minerales calcáreos y pigmentos. El quitosano es un derivado de la quitina que se obtiene en la industria mediante tratamiento de desacetilación química o enzimática. A pesar de que el quitosano tiene grandes propiedades⁽⁴⁾ y es abundante en la naturaleza, en la industria farmacéutica o alimentaria no ha sido admitido como un componente o un excipiente de las formulaciones. El quitosano es muy versátil ya que puede ser modificado físicamente y obtenerse en forma de polvo, perlas de gel, nano partículas, membranas, esponjas, en forma de panal, fibras o también fibras huecas.

El interés de encontrar nuevos recursos naturales que favorezcan a la humanidad ha llevado a indagar sobre la utilización de los desechos de la industria pesquera⁽⁵⁾, tal es el caso de los exoesqueletos de los crustáceos. Estos residuos que se generan en la industria pesquera son considerados contaminantes ambientales, sin embargo, de estos residuos se puede extraer la quitina, y de la quitina se puede obtener el quitosano. Estos biopolímeros a su vez tienen un alto valor nutricional.

Las principales causas de deterioro de alimentos se deben a microorganismos tales como levadura, hongos y bacterias⁽⁶⁾. Este deterioro causa grandes pérdidas económicas para los fabricantes, distribuidores y consumidores.

En la ciudad se ha incrementado el consumo de alimentos conservados para bebés y adultos de la tercera edad, la gran mayoría de estos alimentos no tienen la cantidad necesaria de nutriente o tienen en ella un conservante sintético⁽⁷⁾. Las compotas elaboradas con dos variedades de plátano y enriquecidas con frutas de la misma región cumplen con los requisitos del Codex alimenticio y la Organización de Mundial de la Salud.

En el año 1811 Braconnot extrajo la quitina por primera vez a partir de hongos superiores⁽⁸⁾, no obstante, de mayor importancia fueron los estudios de Hoppe-Seyler, quien agregándole hidróxido potásico concentrado a 180°C a la quitina, obtuvo una molécula soluble en ácido acético a la cual denominó quitosano.

La quitina es la materia prima del quitosano y de otros polímeros; este compuesto, se encuentra en animales (artrópodos, anélidos y moluscos) en hongos (ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos), aunque según sea la fuente presenta ciertas modificaciones químicas. Estas quitinas presentan diferentes características en su estructura cristalina según sea su fuente. La composición de la quitina no es un polímero amigable para incluirlo en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas;

Es por ello, que debe ser procesada en un medio alcalino concentrado y a temperaturas altas de 60°C con el propósito de perder el resto acetilado del grupo acetamida del carbono 2; este tratamiento da lugar al quitosano. La quitina y su derivado el quitosano, a diferencia de los polímeros sintéticos, no genera inconvenientes en relación a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad, además de ser naturalmente abundantes y renovables.

El consumo de crustáceos tiene un alto valor y entre el 70% y 80% son desechos considerados contaminantes, los desechos de crustáceos pueden ser aprovechados para la obtención de dos biopolímeros, la quitina y su derivado funcional el quitosano⁽⁹⁾. En la actualidad, el quitosano es un producto que está generando mucha demanda. Este producto puede ser utilizado en la agricultura, industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, medicina, como por ejemplo en el tratamiento de quemaduras.

El proceso de obtención de la quitina se realiza en varias etapas: en primer lugar, se procede al acondicionamiento de la materia prima⁽¹⁰⁾, seguido de una desproteínización, desmineralización y decoloración; para obtención del quitosano, al producto obtenido se le realiza la desacetilación.

El quitosano en medio ácido presenta carga positiva debido a que se produce una protonización en cada una de sus unidades del grupo amino⁽¹⁵⁾. La glucosamina hace que sea soluble en medio acuoso, diferenciándolo de su polímero matriz. Según diversos autores la quitina tiene una alta actividad biocida y en algunos casos el quitosano ha mostrado una alta capacidad biocida frente a bacterias Gram positivas, como por ejemplo *S. aureus* y *B. cereus*. Esta capacidad biocida parece ser debida a que las cargas positivas del quitosano (NH_3^+) interaccionan con las cargas negativas de las membranas bacterianas.

El objetivo principal del estudio es determinar el efecto antimicrobiano del quitosano obtenido a partir de la quitina de cangrejos (*Chionectes opilio*) añadido en una compota artesanal obtenida a partir de dos especies de plátano peruano, plátano isla (*Musa paradisiaca*) y plátano pildorita (*Musa alinsanaya*).

Métodos

Diseño del estudio y población

El presente estudio se incluye en el ámbito de la investigación aplicada con enfoque cuantitativo⁽¹⁹⁾. Es de tipo experimental-explicativo y tiene como finalidad comprobar el efecto antimicrobiano del quitosano obtenido a partir de la quitina procedente de los crustáceos de los Manglares de Tumbes en compotas de dos variedades de plátano peruano: plátano isla (*Musa paradisiaca*) y plátano pildorita (*Musa alinsanaya*).

La técnica microbiológica utilizada para determinación del efecto antimicrobiano de la solución de quitosano fue el de recuento en placa. Se incluye el análisis de los siguientes parámetros: recuento del número de colonias de hongos y levaduras, observación del tipo de crecimiento, observación de la formación de esporas (conidios y esporangios), y formación de pigmentos; los resultados del recuento se exponen como UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra). Para el estudio del resto de parámetros la técnica utilizada fue la observación directa.

Variables de evaluación

La variable independiente fue la concentración de quitosano obtenido a partir de la quitina de cangrejos (*Chionectes opilio*); la concentración utilizada corresponde con la proporción de quitosano que puede ser disuelto. El producto final obtenido consiste en un polvo blanquecino resultado del proceso de desnaturalización de la quitina.

La variable dependiente fue el efecto antimicrobiano del quitosano que, a una concentración del 80%, presenta la capacidad de matar o inhibir el crecimiento microbiano. Este parámetro se evaluó mediante el procedimiento experimental midiendo el halo de inhibición del crecimiento microbiano.

Tratamiento utilizado

Obtención de quitosano. Se utilizó el método convencional; 1. Recolección, primera limpieza y separación del caparazón de los cangrejos de los Manglares de Tumbes. 2. Limpieza de la muestra con solución jabonosa de clorhexidina al 2% (p/v) en agua destilada. 3. Secado a 76°C. Cantidad obtenida de caparazones: 200,86 g. 4. Trituración de caparazones. Tras este proceso se obtuvo una cantidad de 136 g de los cuales sólo se utilizó 50 g. Despigmentación mediante tratamiento con metanol en frasco ámbar. 5. Desmineralización mediante tratamiento con HCl 0,6N durante 24h. En este proceso se eliminan sales orgánicas (CaCO₃). 6. Desproteínización y desacetilación mediante tratamiento con NaOH 0,3N a 65°C/90 min. 7. Secado a 40° C. 8. Adición de 392 ml de ac. acético (1%, v/v); el producto se mantuvo en caliente a 73°C durante 2h. 9. Precipitación del quitosano: filtrado y ajuste a pH =6 con ac. acético. 10. Se filtró nuevamente agregando agua destilada hasta neutralizar la muestra. 11. Secado del producto resultante (quitosano) a 40° C.

Cuantificación de hongos y levaduras. Medio de cultivo: Agar Sabouraud (Merck). Muestras iniciales: 10 compotas de plátano de cada tipo (isla y pildorita) + 80% de quitosano. Preparación de la muestra: se realizaron 3 diluciones (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) de la muestra original en agua de peptona al 1%, p/v. Se sembraron 2 placas por muestra. La inoculación de las placas se utilizó mediante la técnica de incorporación; para ello se agregaron a las placas 1 ml de cada muestra diluida cubriéndose con una cantidad de agar. Tras homogenización con suaves movimientos rotatorios en ambos sentidos se dejó enfriar. Incubación a 25°C/ 7 días.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico de medida de tendencia central y de dispersión. Además, se realizó el análisis estadístico inferencial para la comprobación de las hipótesis. Para el análisis de las diferencias significativas de las medias independientes se utilizó la prueba paramétrica chi cuadrado, considerándose un margen de error estadístico de 5%.

Ética y confidencialidad de los datos

Para la recolección de las muestras se utilizaron el menor número posible de cangrejos, pero con los que se logren obtener resultados estadísticamente significativos, de esta forma se consideró el impacto negativo en el bienestar de los animales involucrados.

Resultados y Discusión

Comparación del efecto antimicrobiano del quitosano obtenido de cangrejos (*Chionectes opilio*) con y sin el conservante (benzoato sódico).

Se exponen los resultados de la evaluación de las compotas artesanales de plátano isla (*Musa paradisiaca*) y plátano pildorina (*Musa alisanaya*) tratadas térmicamente, y adicionadas de quitosano (80%, p/v) y de conservante.

En la Tabla 1 se observa que las muestras sin tratamiento térmico evidenciaron un alto crecimiento microbiano (>1000 UFC/ml) en el 100% de las muestras analizadas. Este resultado fue mayor al de muestras con tratamiento térmico a excepción de aquellas muestras tratadas térmicamente, pero sin adición de conservante ni de quitosano. Por otro lado, se detectó ausencia de microorganismos en el 60% de muestras adicionadas de quitosano y en el 80% de muestras adicionadas de conservante, ambas tratadas térmicamente. Por otro lado, del total de las muestras de compotas tratadas con quitosano al 80%, el 40% presentaron un resultado de 5 UFC/g, mientras que en las muestras tratadas con conservante el 20% presentaron un resultado de 10 UFC/g; por último, las muestras con tratamiento térmico y sin conservante un 20% de los casos refirieron un resultado de 15 UFC/g.

Tabla 1: Comparación del efecto antimicrobiano expresado como recuento de hongos y levaduras de muestras de compotas de plátano, elaboradas artesanalmente y adicionada de quitosano al 80%, adicionada de conservante (benzoato sódico) y sin conservante.

Muestra de compota (n=5)	Recuento (UFC/g)	Frecuencia	Porcentaje de muestras (%)
T. término + quitosano (80%)	5	2	40
	Ausencia	3	60
T. térmico sin conservante	15	1	20
	25	1	20
	30	1	20
	>500	1	20
	>1000	1	20
T. térmico con conservante	10	1	20
	Ausencia	4	80
Sin tratamiento térmico	>1000	5	100

Tabla 2: Diferencias de medias de los valores en los recuentos de hongos y levaduras en los diferentes tratamientos realizados a muestras de compota de plátano artesanal

Muestra	N	Media	Desviación Estándar	Desv. Error promedio
T. Térmico + Quitosano 80%	5	2,00	2,739	1,225
T. Térmico Sin Conservante	5	314,00	4,355	1,947
T. Térmico Con Conservante	5	2,00	4,472	2,000
Sin Tratamiento Térmico	5	1000,00	0,000	0,000

En la Tabla 2, se expone la media de los recuentos microbianos de los cuatro grupos de muestras estudiados para evaluar la actividad antimicrobiana frente hongos y levaduras. Las muestras sin tratamiento térmico dieron como resultado recuentos muy superiores al resto de los grupos evaluados (1000 UFC/g), seguido de las muestras con tratamiento sin conservante, las cuales refirieron una media de 314 UFC/g; Por otro lado, se observa que el tratamiento con quitosano al 80% (p/v) y con conservante dieron como resultado una media de 2 UFC/g en ambos casos.

Tabla 3: Prueba Anova de los recuentos de hongos y levaduras en los diferentes tratamientos antimicrobianos en una compota de plátano artesanal.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Prueba de Fisher	Sig.
Entre grupos	3321615,000	3	1.107.205,000	23,344	0,000
Dentro de grupos	758880,000	16	47.430,000		
Total	4080495,000	19			

*Valores de p significativo a un nivel de significancia de 0,05

En la Tabla 3, se describe la prueba de Anova de un factor, donde el valor del nivel de significancia (Sig.) es 0,000 entre los grupos con diferentes tratamientos analizados para el recuento de hongos y levadu-

ras. Este resultado es menor que el nivel de significancia de 0,05 donde p-valor es menor que 0,05 y por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis (H1)

Tabla 4: Comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey de los recuentos de hongos y levaduras en los tratamientos de una compota de plátano artesanal.

(I) Muestra	(J) Muestra	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
D	A	-312,000	0,148
	B	0,000	1,000
	C	-998,000*	0,000
A	D	312,000	0,148
	B	312,000	0,148
	C	-686,000*	0,001
B	D	0,000	1,000
	A	-312,000	0,148
	C	-998,000*	0,000
C	D	998,000*	0,000
	A	686,000*	0,001
	B	998,000*	0,000

A: Tratamiento térmico sin conservante. B: Tratamiento térmico con conservante. C: Sin tratamiento térmico.

D: Tratamiento térmico + quitosano (80%, p/v).

*Desv. error para todas las muestras es de 137,739.

En la Tabla 4, al comparar las diferencias entre las medias de los valores obtenidos en los recuentos de hongos y levaduras en los diferentes tratamientos de efecto antimicrobiano de una compota de plátano artesanal, se observa que las muestras bajo tratamiento térmico + quitosano al 80% (D) no indican diferencias significativas con las muestras tratadas con y sin conservante al ofrecer una significancia de $p=0,148$ y $p=1,000$ respectivamente, mayores al nivel de significancia establecido en la investigación ($p>0,05$). Mientras que, con las muestras sin tratamiento térmico (C), se evidencian diferencias significativas $p\text{-valor}=0,000$.

Las muestras bajo tratamiento térmico sin conservante (A) no refieren diferencias significativas con los grupos de tratamientos de quitosano al 80% ($p=0,148$) y con conservante ($p=0,148$). Sin embargo, si se evidencian diferencias significativas con el grupo que no recibió tratamiento ($p=0,001$).

Por su parte, las muestras bajo tratamiento térmico con conservante (B) no refieren diferencias significativas con los grupos de tratamientos de quitosano al 80% ($p=1,000$) y sin conservante ($p=0,148$), evidenciando diferencias significativas con el grupo que no recibió tratamiento ($p=0,000$).

De esta manera a través de los resultados obtenidos en la prueba de Tukey se verifica que los recuentos de hongos y levaduras en las muestras de compota de plátano artesanal entre los grupos son iguales para las muestras tratadas con quitosano al 80% (p/v), con y sin conservante (benzoato sódico), y diferente para las muestras que no recibieron tratamiento. Es decir, en el estudio planteado se verifica que el quitosano surte un efecto antimicrobiano frente a hongos y levaduras.

Tabla 5: Subconjuntos agrupados en la prueba de Tukey del recuento de hongos y levaduras en los tratamientos de una compota de plátano artesanal.

Muestra: Compota	Numero de muestra	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
Tratada térmicamente + quitosano 80%	5	2,00	
Tratada térmicamente + benzoato sódico	5	2,00	
Tratada térmicamente - benzoato sódico	5	314,00	
Sin tratamiento térmico	5		1000,00
Sig.		0,148	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
Se utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000

En la Tabla 5, según las medias obtenidas de los recuentos de hongos y levaduras, y de acuerdo con la prueba de Tukey no existen diferencias entre los tratamientos térmicos + quitosano al 80%, tratamiento térmico con y sin conservante, dado que se alinean en el mismo grupo (1), mientras que las muestra que no recibieron tratamiento por presentar diferencias significativas se alinean al grupo 2.

Los resultados de la presente investigación acerca del efecto antimicrobiano del quitosano obtenido de la quitina de los cangrejos de los Manglares de Tumbes, exponen que el recuento de hongos y levaduras en las muestras de compotas de plátanos artesanales tratadas con quitosano al 80%, mostraron que del total de muestras analizadas (n= 5), en el 60% no crecieron ni hongos ni levaduras y en el 40% hubo crecimientos de 5 UFC/g de estos microorganismos. Es decir, el quitosano al 80% surte un efecto antimicrobiano en las muestras de compotas procesadas, dado que existe una mayor proporción donde no crecen ni hongos ni levaduras.

En los resultados estadísticos se evidencia un p valor Sig.= 0,000 asociado al coeficiente F= 23,344 de la prueba de análisis de varianza (Anova) en los recuentos de hongos y levaduras en los diferentes tratamientos antimicrobianos en las muestras de compota de plátano artesanal, que por ser mayor al nivel de significancia establecido ($p>0,05$), indica que existen diferencias entre el valor medio de los diferentes tratamientos en las muestras de compotas artesanales. De esta manera a través de los resultados obtenidos en la prueba de Tukey se verifica que los recuentos de hongos y levaduras en las muestras de compota de plátano artesanal entre los grupos son iguales para las muestras tratadas con quitosano al 80%, sin y con conservante (benzoato sódico), y diferente para las muestras que no recibieron tratamiento. Es decir, en el estudio planteado se verifica que el quitosano tiene un efecto antimicrobiano.

Conclusiones

El quitosano obtenido a partir de la quitina de cangrejos procedentes de los Manglares de Tumbes tiene efecto antimicrobiano en las muestras de compotas procesadas de dos variedades de plátano peruano.

El efecto antimicrobiano contra hongos y levaduras en muestras de compotas procesadas se produce a una concentración óptima de quitosano al 80%.

Se obtuvieron resultados similares al comparar el quitosano de cangrejos al 80% y el conservante benzoato sódico en compotas artesanales de dos especies de plátano peruano.

Bibliografía

1. Tang Z-X, Qian J-Q, Shi L-E. Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007;136(1):77-96. DOI: 10.1007/bf02685940
2. Fikry M Reicha, Afaf Sahan, Maysa I, Abdel -Hamid, Ibrahim M, El-Sherbiny. Preparation of silver nanoparticles in the presence of chitosan by electrochemical method. *Carbohydrate Polym*. 2012; 89(1):236-244. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.002
3. Araya L. Meneses. Influencia de Algunos Ácidos Orgánicos Sobre las Propiedades Físico-Químicas de Películas de Quitosano Obtenidas a Partir de Desechos de Cangrejos. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*. Ecuador. 2010; 23(1): 143-148. Disponible en: <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/47/19>
4. Hidalgo C, Fernández M, Nieto O, Paneque A, Fernández G, Llopiz J. Estudio de Quitosanos Cubanos Derivados de la Quitina de la Langosta. *Rev Iberoam Polím. La Habana*. 2009; 10(1): 11-27. Disponible en: <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2009-hidalgo.pdf>
5. Nidia Paz et al. Optimización del Proceso de Obtención de Quitosano Derivada de la Quitina de Langosta. *Rev Iberoam Polím. La Habana*. 2012; 13(3): 103-116. Disponible en: <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2012-paz.pdf>
6. Rodríguez E. Uso de agentes Antimicrobianos Naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 2011; 7(1): 153-170. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46116742014>
7. Troncoso C. Alimentación del adulto mayor según lugar de residencia. *Horiz Med*. 2017; 17(3): 10. DOI: 10.24265/horizmed.2017.v17n3.10
8. Cabrel Rengifo S, Untiveros Bermúdez G, Aguilar Olano JL. Influencia del pH en la liberación del factor de crecimiento de plaquetas (PDGF-BB) a partir de un hidrogel a base de B-quitosano. *Rev Soc Quim Peru*. 2019; 85(4): 440-451. DOI: 10.37761/rsqp.v85i4.258
9. Pesantez F, Cuenca-Torres M. Obtención de quitosano provenientes del cangrejo rojo combinado con almidón de banano para formar filmes. *Conference Proceedings UTMACH*. 2018; 2(1):179-187. Disponible en: <https://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/article/view/328/270>
10. Colina M, et al. Evaluación de los Procesos para la Obtención Química de Quitina y Quitosano a Partir de Desechos de Cangrejos. Escala piloto e Industrial. *Rev Iberoam Polím. La Habana*. 2014; 15(1); 21-43. Disponible en: <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2014-colina.pdf>
11. Realpe AM, Humberto O. Alimentación Complementaria en el Primer Año Vida. *GastrohNup*. 2016; 18(1): 43-47. DOI: 10.25100/gnup.v18i1.1254
12. Davidson M, Taylor T, Schmidt S. *Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds*. 4ª ed. Editores Michael P. Doyle, Roberto L. Buchanan. 2012. DOI:10.1128/9781555818463.ch30
13. Luna J, Hernández I, Rojas A, Cadena M. Estado Nutricional y neurodesarrollo en la primera infancia. *Rev Cubana Salud Pública*. 2018; 44(4): 169-185. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rcsp/v44n4/1561-3127-rcsp-44-04-169.pdf>
14. López B, Carvajal de Pabon L, Elaboración de un alimento con base en harina de banano (*Musa paradisiaca*) fortificada con hierro y zinc aminoquelados, calcio microencapsulado y folato. *Perspect Nut Hum*. 2012; 14(1): 47-57. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v14n1/v14n1a5.pdf>
15. Younes I, Rinaudo M. Chitin and Chitosan preparation from marine source. Structure, properties and applications. *Mar Drug*. 2016 13(3): 1133-74 DOI: 10.3390/md13031133
16. Lárez C. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*. 2008; 8(1):1-22. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08002>
17. Pérez A et al. Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Rev Colomb Biotechnol*. 2014; 16(1): 104-110. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44251

- 18.** Valenzuela C, Arias J. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances En Ciencias Veterinarias*. 2012; 27(1). DOI: 10.5354/acv.v27i1.21997
- 19.** Carrasco Diaz S. Metodología de la Investigación Científica: pautas metodológicas para diseñar y elaborar el proyecto de investigación. 2da edición Lima-Perú: Editorial San Marcos, 2013.272 P.
- 20.** Mármol Z, et al. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. 2011; 1. 53-58. Disponible en: file:///C:/Users/jhonn/Downloads/Quitinayquitosano.pdf

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i4.24740

Artículos de revisión

Intensificación de Ustekinumab en enfermedad de Crohn: Revisión sistemática

Ustekinumab intensification in Crohn's disease: a systematic review

Tania González Furelos¹  0000-0002-0190-2802

María Sobrido Prieto¹  0000-0002-6411-1020

Iria Rodríguez Legazpi¹  0000-0001-8582-4444

¹Universidad de A Coruña, Departamento de Ciencias Médicas, A Coruña, España.

Correspondencia

Tania González Furelos
tania.gonzalez.furelos@sergas.es

Recibido: 20.05.2022

Aceptado: 14.09.2022

Publicado: 28.09.2022

Financiación

Sin financiación.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Resumen

Introducción: Ustekinumab surge como una alternativa terapéutica en enfermedad de Crohn en pacientes con fracaso a anti-TNF. Sin embargo, en muchas ocasiones, es habitual tener que reducir/acortar sus tiempos de administración para evitar el fracaso terapéutico. El objetivo de esta revisión sistemática es evaluar la efectividad de la intensificación de ustekinumab mediante el acortamiento de su intervalo terapéutico.

Método: Se realizó una revisión sistemática de la literatura basada en las directrices de la declaración PRISMA. Se consultaron las bases de datos Medline, Embase y Web of Science, incluyéndose estudios con adultos diagnosticados de enfermedad de Crohn moderada o grave a los que se le hubiera realizado como intervención un cambio de posología del fármaco ustekinumab mediante acortamiento de intervalo a cada 4 semanas.

Resultados: Se incluyeron 5 artículos, siendo uno de ellos una revisión sistemática. A los 6 meses se muestran tasas de remisión clínica en torno al 45%, una reducción media de 3 puntos en el índice de Harvey Bradshaw sobre el nivel basal, así como una normalización de niveles de PCR en un 21% de los pacientes.

Conclusiones: Los resultados apoyan el uso del acortamiento de intervalo de ustekinumab como una opción terapéutica efectiva y útil para pacientes con pérdida de respuesta a la pauta habitual. Sin embargo, se recomienda realizar nuevos estudios de diseño experimental que aumenten el nivel de evidencia existente.

Palabras clave: Ustekinumab; optimización; enfermedad inflamatoria intestinal.

Abstract

Introduction: Ustekinumab emerges as a therapeutic alternative in Crohn's disease in patients with anti-TNF failure. However, on many occasions, it is common to have to reduce/shorten their administration times to avoid therapeutic failure. The objective of this systematic review is to evaluate the effectiveness of ustekinumab intensification by shortening its therapeutic interval.

Method: A systematic review of the literature based on the guidelines of the PRISMA statement was performed. The Medline, Embase and Web of Science databases were consulted, including studies with adults diagnosed with moderate or severe Crohn's disease who had undergone a change in ustekinumab dosage as an intervention by shortening the interval to every 4 weeks.

Results: Five articles were included, one of them being a systematic review. At 6 months, clinical remission rates of around 45% are shown, an average reduction of 3 points in the Harvey Bradshaw index over baseline, as well as a normalization of CRP levels in 21% of patients.

Conclusions: The results support the use of ustekinumab interval shortening as an effective and useful therapeutic option for patients with loss of response to the usual regimen. However, it is recommended to carry out new studies of experimental design that increase the level of existing evidence.

Keywords: Ustekinumab; optimization; inflammatory bowel disease.

Puntos clave

En la enfermedad de Crohn refractaria a terapia sistémica se dispone de diferentes alternativas de los denominados fármacos biológicos, entre ellas la optimización de esta terapia. En casos de enfermedad refractaria a la pauta habitual, la intensificación de ustekinumab mediante acortamiento de intervalo puede resultar útil y eficaz.

Esta revisión sistemática aporta información sobre la efectividad de la optimización del tratamiento de ustekinumab. Esto permitirá generar mayor evidencia que respalde el uso en la práctica clínica de estrategias de optimización de forma eficaz y segura.

Introducción

La enfermedad de Crohn (EC) se define como una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) crónica de causa no totalmente determinada. Puede afectar a cualquier tramo del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, siendo más frecuente su presencia en la región ileocecal. Se caracteriza por afectar a todas las capas de la pared intestinal (enfermedad transmural); es decir, a todo el grosor del intestino, lo que puede condicionar la aparición de un estrechamiento del intestino, conocido como estenosis, e incluso en ocasiones su completa oclusión. Con frecuencia puede presentar trastornos sistémicos. Se han evidenciado manifestaciones extraintestinales en órganos como articulaciones, piel, ojos y vía biliar, las cuales pueden tener un impacto importante en la calidad de vida, morbilidad y mortalidad de los pacientes⁽¹⁾. La incidencia de EC en Europa varía de 0,3 a 12,7 por 100.000 habitantes⁽¹⁾, y los últimos estudios sitúan la incidencia en España en torno a 7,4 por 100.000 habitantes⁽²⁾

Las estrategias terapéuticas deben apuntar a modificar el curso clínico, logrando remisión de la enfermedad, evitando de este modo progresión a fenotipos penetrantes o fibroestenóticos que podrían requerir mayor necesidad de hospitalizaciones y/o cirugías y que pueden finalmente inhabilitar a los pacientes para las actividades de la vida diaria.

Los medicamentos utilizados en el tratamiento de la EC tienen como objetivo disminuir la inflamación crónica anormal, actuando sobre las vías inmunológicas de la enfermedad. Sin embargo, todavía se carece de pruebas sólidas que respalden una etiología probable de la EC y no existe un tratamiento curativo.

Dentro del arsenal terapéutico se incluye la terapia biológica, entre los que se encuentran distintos fármacos como agentes anti-factor de necrosis tumoral (TNF), infliximab y adalimumab; agentes anti-integrinas como el vedolizumab, y por último el fármaco anti-IL12/23 ustekinumab⁽³⁾.

Los agentes anti-TNF son efectivos para el tratamiento de la EC de moderada a grave y suelen ser la primera terapia biológica usada; sin embargo, las estrategias de tratamiento para los pacientes que no responden o pierden la respuesta a los agentes anti-TNF son un tema importante a abordar⁽⁴⁾.

Ustekinumab surge como una molécula efectiva en pacientes con fracaso a anti-TNF⁽⁵⁾. Sin embargo, en la práctica clínica la pauta habitual no es suficiente y se llega a emplear diferentes estrategias, como reducir/acortar sus tiempos de administración, para evitar el fracaso terapéutico^(3,6,7). A pesar de ser esta una práctica frecuente, no existe ninguna evidencia sólida que respalde su efectividad.

El objetivo de esta revisión sistemática es evaluar la efectividad de la intensificación de ustekinumab mediante acortamiento de intervalo terapéutico.

Métodos

Diseño del estudio y población

Se realizó una revisión sistemática de la literatura basada en las directrices de la declaración PRISMA⁽⁸⁾.

Pregunta de investigación:

En pacientes adultos diagnosticados de enfermedad de Crohn (moderada o grave) que presentan pérdida de eficacia con la pauta habitual de ustekinumab ¿Es efectiva la estrategia de intensificación?

P: pacientes adultos diagnosticados de enfermedad de Crohn moderada o grave.

I: intensificación del fármaco ustekinumab mediante acortamiento de intervalo.

O: el acortamiento de intervalo.

Criterios de selección:

Se seleccionaron los estudios que incluyeran pacientes adultos diagnosticados de enfermedad de Crohn moderada o grave a los que se les haya realizado como intervención un cambio de posología del fármaco ustekinumab mediante acortamiento de intervalo a cada 4 o cada 6 semanas.

Se limitó la selección a revisiones sistemáticas, estudios experimentales y observacionales en los idiomas español e inglés, publicados en los últimos 5 años.

Se excluyeron abstract a congresos, series de casos y cartas al editor.

Estrategia de búsqueda:

En febrero de 2022 se llevó a cabo una búsqueda en las principales bases de datos, Medline, Embase y Web of Science. La búsqueda se realizó en dos fases: búsqueda de revisiones sistemáticas y estudios de investigación. La estrategia completa está disponible en el Anexo 1.

Los resultados obtenidos en estas bases de datos han sido descargados en el gestor bibliográfico Zotero, con el fin de eliminar los duplicados. El total de resultados obtenidos ha sido 36.

Selección de artículos y evaluación de la calidad metodológica:

Con el fin de seleccionar aquellos artículos que cumplieren los criterios de inclusión, se llevó a cabo una búsqueda en tres fases; lectura por título, por resumen y por texto completo. Se han seleccionado un total de 4 artículos.

Para la evaluación de la calidad se consideró que los estudios que no cumplían con al menos el 58% de los ítems incluidos contenían fallos metodológicos sustanciales.

En el caso de la revisión sistemática se siguieron los criterios PRISMA⁽⁸⁾. La revisión Meserve⁽⁹⁾ alcanzaba 16 de los 27 puntos. En el caso de estudios observacionales, se estableció la escala STROBE⁽¹⁰⁾. Los artículos alcanzaban 13 de los 22 puntos de los criterios.

Para la evaluación y jerarquización de los niveles de evidencia hemos empleado la escala Oxford Centre for Evidence-based Medicine (OCEBM)⁽¹¹⁾.

Variables de evaluación

Para realizar el análisis de los diferentes artículos se han analizado 2 tipos de variables:

- Variable de respuesta clínica:
 - Respuesta clínica: entendida como una disminución en el Índice de Harvey-Bradshaw (IHB) \geq 2 puntos.
 - Media de disminución del nivel de PCR.
 - Tasa de remisión clínica: porcentaje de pacientes que alcanzan la remisión clínica tras la intensificación.
- Tasa de Normalización del nivel de PCR (<5 mg/L): porcentaje de pacientes que alcanzan un nivel de PCR inferior a 5 mg/L tras la intensificación.
- Aumento de los niveles de fármaco en sangre: se revisará la mediana de aumento en los niveles de fármaco en sangre tras la intensificación.

Resultados

Se obtuvieron un total de 76 artículos de los cuales se excluyeron 72 por no cumplir los criterios, quedándonos con 4 artículos. El diagrama de flujo de selección se muestra en la Figura 1.

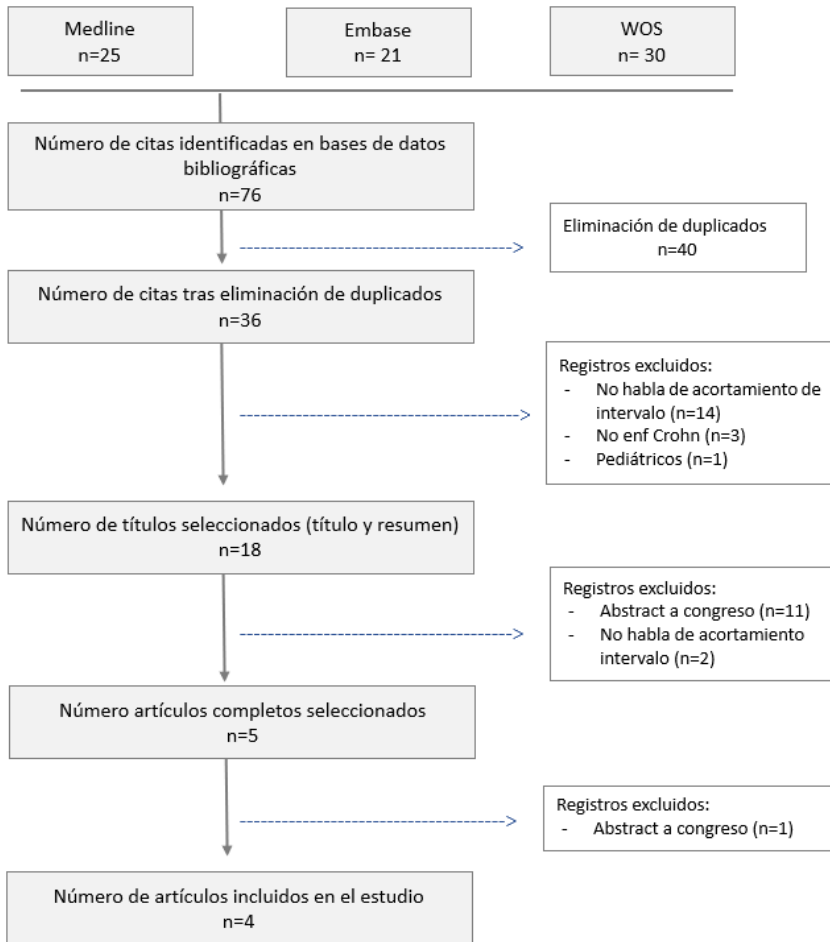


Figura 1: Diagrama de flujo

A continuación, se presentan los resultados globales obtenidos para cada una de las variables.

Resultados de la revisión sistemática

Se seleccionó una revisión sistemática⁽⁹⁾ que incluía a 925 pacientes de un total de 15 artículos (8 estudios de cohortes y 7 abstract de congreso). De los 925 pacientes, 220 fueron intensificados con acortamiento de intervalo. Los resultados más relevantes mostraron una tasa de remisión clínica del 40% y una tasa de normalización de PCR en el 21% de los pacientes.

Resultados principales de los estudios originales

Se obtuvieron un total de 3 estudios, todos ellos estudios de cohortes. Los principales resultados obtenidos fueron los que se presentan a continuación:

- Tasa de remisión clínica: Todos los estudios alcanzaron la remisión clínica tras la intensificación. Todos incluyeron remisión del 45% (42-50,9%) a los 6 meses. Además dos de ellos^(12,13) presentan datos a corto plazo, con tasas de remisión en torno a un 31% a los 2,4 meses y del 38,7% a los 4 meses.
- Respuesta clínica: Se evaluó la respuesta clínica mediante la disminución del IHB. Los resultados de dos estudios muestran una reducción media a los 6 meses de 3 puntos en el IHB sobre el nivel basal. En ambos estudios a los 6 meses los pacientes presentan niveles de IHB de 3 puntos.

Otros datos de interés: Además de las principales variables de respuesta, también se evaluaron:

- Valores de PCR: La reducción media de niveles de PCR es de 5,15 mg/L desde los niveles basales. Los pacientes a los 6 meses reducen los valores de PCR a una media de 3,5 mg/L. La tasa de normalización de PCR se produce en el 21,33% de los pacientes.
- Niveles de fármaco en sangre: ningún estudio analizó el nivel de fármaco en sangre.

Tabla 1: Síntesis de resultados

Referencia	Pacientes	Tasa remisión clínica	Disminución en IHB	Disminución de niveles de PCR	Normalización PCR
Fumery ⁽¹²⁾	100	A los 2,4 meses: 31%. A los 6 meses: 49 %	A los 2,4 meses: disminución de 8 puntos (RIQ, 5.0 – 11.2) a 5 puntos (RIQ, 3.0–7.0). A los 6 meses: de 7(IQR 5-10) a 3,5 (IQR, 2 – 5)	A los 2,4 meses: disminución de 12,3 (IQR, 5.0 – 30.5) a 9,6 (IQR, 3.2–18.0) mg/dl. A los 6 meses: disminución de 9.3 (IQR, 3.2 – 21.1) a 4 (IQR, 1.2 – 10.2) mg/dl	No consta
Kopylov ⁽¹³⁾	142	A los 4 meses: remisión en el 38,7% de pacientes A los 6 meses: 42% de pacientes	No consta	No consta	21% de los pacientes
Ollech ⁽¹⁴⁾	506 (110 intensificados)	A los 6 meses: 50,9% de pacientes	A los 6 meses: de 4,5 a 3 puntos (p = .002)	A los 6 meses: disminución de 8 a 3 mg/L (p = .031)	22% de los pacientes

Discusión

La presente revisión pretende mostrar la efectividad del acortamiento de intervalo posológico del fármaco ustekinumab. Los artículos incluidos, una revisión sistemática y tres estudios de cohortes, muestran una tasa de remisión clínica en torno a un 45% (42-50,9%), lo que sugiere que la optimización puede ser una estrategia terapéutica importante.

Estos resultados parecen ratificar lo que Haider et al.⁽⁷⁾ mostraban en su estudio. En él evaluaron la efectividad de la intensificación mediante la variable evaluación global del médico (PGA por sus siglas en inglés) y sus resultados muestran que el aumento de dosis mejora los resultados clínicos y previene el empeoramiento de la enfermedad.

A pesar de los resultados obtenidos, un amplio porcentaje de pacientes no alcanza la remisión tras la intensificación. Estudios publicados como el de Dalal et al.⁽⁶⁾ muestran una remisión libre de corticoides para el 55% de los pacientes intensificados. Sin embargo, sugieren que la intensificación puede no ser igual de efectiva en todos los pacientes, e identifican posibles predictores de fallo en la respuesta como podrían ser la enfermedad perianal, el uso actual de corticoides, etc. Estos resultados podrían ayudar a optimizar todavía mejor la intensificación del fármaco, pudiendo establecer una priorización sobre aquellos pacientes que se prevé que no tengan fallo de respuesta.

Sin embargo, se deben tener presentes las distintas limitaciones metodológicas presentadas, que se describen a continuación:

- a. Diseño de los estudios: este estudio incluye una revisión sistemática y 3 estudios de cohortes.

Con respecto a la revisión sistemática, está elaborada por estudios de cohortes y abstracts de congreso, por lo que el nivel de evidencia desciende considerablemente.

Con respecto a los estudios de investigación, se trata de estudios de cohortes. Hasta el momento, no hay estudios experimentales sobre el acortamiento del intervalo de ustekinumab en enfermedad de Crohn. Entendemos que esto es debido a un coste considerable, tanto económico como de recursos humanos y de tiempo.

- b. Medida de los resultados: dos han sido las limitaciones detectadas

En primer lugar, no todos los estudios han analizado las variables relevantes para la consecución de los objetivos. Así, no todos contienen la disminución en el índice de Harvey Bradshaw, disminución de los niveles de PCR en sangre (en valor absoluto), ni la tasa de normalización de PCR tras la intensificación. Esto es debido a que no todos los clínicos evalúan la respuesta de la misma forma. En la práctica clínica habitual no se mide el índice de Harvey Bradshaw en todas las visitas, por lo que, al ser estudios retrospectivos, puede que no se disponga de esta información. Esto hace más difícil evaluar los resultados ya que no todos los estudios contemplan las mismas variables de respuesta. Por otra parte, ninguno de los estudios incluyó la medición de niveles de ustekinumab en sangre. Esto puede ser debido a dos motivos, en primer lugar, al ser estudios de carácter retrospectivo, puede que no se contemplara la monitorización del fármaco en la mayoría de los centros, y en segundo lugar, esto supondría un coste adicional, por lo que no todos los hospitales disponen de la monitorización farmacocinética. También se debe destacar que ninguno de los estudios incluyó la monitorización de niveles de fármaco en sangre. Teniendo en cuenta que este aspecto actualmente es una herramienta fundamental a la hora de toma de decisiones terapéuticas, parece importante destacar la necesidad de incluir esta variable en futuros estudios^(15,16).

A la vista de los resultados obtenidos se puede apreciar una recuperación de la respuesta clínica con el acortamiento del intervalo a cada 4 semanas. Casi la mitad de los pacientes consiguen la remisión clínica tras la intensificación a los seis meses y también se observa una clara mejoría de los parámetros analíticos como la PCR, con disminución de sus valores respecto a los basales llegando a normalizarse en un 21% de los pacientes.

Es necesario señalar que hoy en día no existen ensayos clínicos que permitan realizar una comparación directa.

Atendiendo a la jerarquización de la de evidencia⁽¹¹⁾, los estudios incluidos (casos-controles y cohortes) aportarían un nivel de evidencia 3a, 3b, lo que aporta una validez moderada.

Con todo, esta revisión muestra la utilidad de la optimización terapéutica de ustekinumab, fundamental en este tipo de patologías donde las opciones terapéuticas pueden ser limitadas.

Así mismo, conviene tener en cuenta que las estrategias de optimización podrían evitar costes derivados de intervenciones quirúrgicas o ingresos hospitalarios, así como costes indirectos, debidos a brotes de la enfermedad. Pero sobre todas ellas, nos gustaría destacar la contribución positiva en la calidad de vida de los pacientes, un aspecto que podría ser interesante evaluar en futuros estudios.

Conclusiones

La intensificación mediante acortamiento de intervalo de ustekinumab a 4 semanas parece obtener tasas de remisión clínica en torno al 40-45% y con un 21% de pacientes con normalización de la PCR. El acortamiento de intervalo podría considerarse una opción terapéutica efectiva y útil para pacientes con pérdida de respuesta a la pauta habitual.

Sería necesario la realización de estudios experimentales que confirmen estos hallazgos y donde se incluyan la medición farmacocinética de niveles de fármaco en sangre, de forma que ayude en la toma de decisiones.

Bibliografía

1. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson, J. Larry Loscalzo J. Harrison. Principios de medicina interna. Vol. 2, 19 ed. México D.F: McGRAW HIL, editor.; 2016. 1947-1964 p.
2. Chaparro M, Garre A, Núñez Ortiz A, Diz-Lois Palomares MT, Rodríguez C, Riestra S, et al. Incidence, Clinical Characteristics and Management of Inflammatory Bowel Disease in Spain: Large-Scale Epidemiological Study. *J Clin Med.* 2021;10(13):2885. Doi 10.3390/jcm10132885
3. Srinivasan A, De Cruz P, van Langenberg DR. Ustekinumab dose intensification for loss of response—should we re-induce before shortening the dose interval? *Aliment Pharmacol Ther.* 2020;52(3):564–5. Doi: 10.1111/apt.15883
4. Paredes JM, Moreno-Osset E. Manejo práctico de la intensificación del tratamiento biológico en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfer Inflammatoria Intest al Día.* 2016;15(3):96–103. Doi: 10.1016/j.eii.2016.04.004
5. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2012;367(16):1519–28. Doi 10.1056/NEJMoa1203572
6. Dalal RS, Njie C, Marcus J, Gupta S, Allegretti JR. Predictors of Ustekinumab Failure in Crohn's Disease After Dose Intensification. *Inflamm Bowel Dis.* 2021;27(8):1294–301. Doi:10.1093/ibd/izaa282
7. Haider SA, Yadav A, Perry C, Su L, Akanbi O, Kudaravalli P, et al. Ustekinumab dose escalation improves clinical responses in refractory Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol.* 2020;13:1756284820959245. Doi: 10.1177/1756284820959245
8. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group. (2009) Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(6): e1000097. Doi:10.1371/journal.pmed1000097.
9. Meserve J, Ma C, Dulai PS, Jairath V, Singh S. Effectiveness of Reinduction and/or Dose Escalation of Ustekinumab in Crohn's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;S1542-3565(21)01084-3. Doi: 10.1016/j.cgh.2021.10.002
10. Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for Reporting Observational Studies. *PLoS Med* 2007; 4: e296. Doi: 10.1371/journal.pmed.0040296.
11. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine: Levels of Evidence (March 2009) — Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM), University of Oxford [Internet]. [cited August 25, 2022]. Available at: <https://>

www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/oxford-centre-for-evidence-based-medicine-levels-of-evidence-march-2009

12. Fumery M, Peyrin-Biroulet L, Nancey S, Altwegg R, Gilletta C, Veyrard P, et al. Effectiveness and Safety of Ustekinumab Intensification at 90 mg Every 4 Weeks in Crohn's Disease: A Multicentre Study. *J Crohns Colitis*. 2021;15(2):222–7. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa177
13. Kopylov U, Hanzel J, Liefferinckx C, De Marco D, Imperatore N, Plevris N, et al. Effectiveness of dose escalation in Crohn's disease patients with insufficient response to standard-dose subcutaneous ustekinumab maintenance therapy: A multicentre international cohort study. *J Crohns Colitis*. January 2020;14:S111–S111. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz203.113
14. Ollech J, Normatov I, Peleg N, Patel S, Rai V, Wang JD, et al. Effectiveness of Ustekinumab Dose Escalation in Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(6):S961–S961.
15. Thomann AK, Schulte LA, Globig AM, Hoffmann P, Klag T, Itzel T, et al. Ustekinumab serum concentrations are associated with clinical outcomes in Crohn's disease - a regional multi-center pilot study. *Z Gastroenterol*. 2020;58(5):439–44. Doi: 10.1055/a-1088-1461
16. Aguiar Zdovc J, Hanžel J, Kurent T, Sever N, Koželj M, Smrekar N, et al. Ustekinumab Dosing Individualization in Crohn's Disease Guided by a Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1587. Doi: 10.3390/pharmaceutics13101587

Anexo 1: Estrategia de búsqueda bibliográfica

Búsqueda de revisiones sistemáticas

La estrategia de búsqueda realizada fue la que se presenta a continuación:

```
Medline:
("Ustekinumab"[Mesh] OR "Ustekinumab"[TITLE] OR stelara[TITLE])
AND
("Crohn Disease"[Mesh] OR Crohn* [TITLE])
AND
(dose* OR intensification OR dosing* OR optimizat* )
Limit: Systematic Review. In the last five years. English, Spanish
```

Resultados: 2

Búsqueda de estudios originales

```
Medline:
("Ustekinumab"[Mesh] OR "Ustekinumab"[TITLE] OR stelara[TITLE])
AND
("Crohn Disease"[Mesh] OR Crohn* [TITLE])
AND
(dose* OR intensificat* OR dosing* OR optimizat* OR Shorten*)
Limit: Clinical Trial, Controlled Clinical Trial, Multicenter Study, Observational Study, in the last 5 years, English, Spanish
```

Resultados: 23

```
Embase:
(ustekinumab or stelara)
AND
Crohn*
AND
(dose* OR intensificat* OR dosing* OR optimizat* OR Shorten*)
Limit: limit 1 "2018 -Current", limit 2 to exclude medline journals
```

Resultados: 21

Web of Science:
(ustekinumab OR stelara)
AND
Crohn*
AND
(dose* OR intensificat* OR dosing* OR optimizat* OR Shorten*) (Title)
Limit: exclude Medline Database, English, 2018 -2021.

Resultados: 30

© BY-NC-SA 4.0

doi: 10.30827/ars.v63i4.25339

Artículos de revisión

Nutrición parenteral suplementada en el final de la vida: consideraciones nutricionales y tecnológicas

Supplemented parenteral nutrition at the end-of life: nutritional and technological considerations

Francisco Rivas-García¹  0000-0002-4488-8262

Rafael Giménez-Martínez²  0000-0003-3640-0738

Margarita López-Viota Gallardo³  0000-0002-7632-8868

¹Unidad Municipal de Salud y Consumo. Excmo. Ayuntamiento de Guadix (Granada).

²Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

³Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Correspondencia

Francisco Rivas García
saludyconsumo@guadix.es

Recibido: 10.07.2022

Aceptado: 05.09.2022

Publicado: 28.09.2022

Financiación

El presente trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Resumen

Introducción: El final de la vida (FV) implica un periodo en el cual una determinada enfermedad u otra situación conducen a un inexorable camino hacia la muerte. La situación clínica hace muy complejo el abordaje del FV, especialmente en aquellos estadios donde la vía parenteral constituye la única forma para proporcionar el soporte nutricional.

Método: Se realizó una revisión bibliográfica narrativa basada en la búsqueda, en distintas bases de datos tales como Medline, Science Direct y Scopus, de todos los artículos publicados, hasta marzo de 2021, que muestran una serie de consideraciones nutricionales y tecnológicas de la nutrición parenteral (NP) suplementada y sus posibles beneficios en el FV.

Resultados: Se hace necesario realizar una adecuada monitorización del FV con NP para determinar la importancia de adicionar suplementos nutricionales, por sus efectos beneficiosos, tales como glutamina, arginina, zinc, cromo, citrulina, selenio, zinc o coenzima Q para atenuar las alteraciones propias del FV y evitar nuevas complicaciones. También, deben considerarse una serie de criterios tecnológicos que garanticen la estabilidad de la NP y sus nutrientes.

Conclusiones: La NP suplementada que se administra en el FV implica controlar una serie de factores que están implicados en su estabilidad. Se han observado acciones beneficiosas de NP suplementada con zinc, selenio, cromo y taurina.

Palabras clave: nutrición parenteral; enfermedad crítica; suplementos dietéticos; enfermo terminal.

Abstract

Introduction: The end of life (OL) implies a period in which a certain disease or other situation leads to an inexorable path towards death. The clinical situation makes the approach to VF very complex, especially in those stages where the parenteral route is the only way to provide nutritional support.

Method: A narrative bibliographic review was carried out based on the search in different databases such as Medline, Science Direct and Scopus of all the articles published until March 2021 that show a series of nutritional and technological considerations of supplemented parenteral nutrition (PN) and your possible benefits at EOL.

Results: It is necessary to carry out adequate monitoring of FV with PN to determine the importance of adding nutritional supplements, due to their beneficial effects, such as glutamine, arginine, zinc, chromium, citrulline, selenium, zinc or coenzyme Q to attenuate the alterations typical of FV and avoid new complications. Also, a series of technological criteria must be considered to guarantee the stability of the NP and its nutrients.

Conclusions: The supplemented PN that is administered in the FV involves controlling a series of factors that are involved in its stability. Beneficial actions have been observed with NP supplemented with zinc, selenium, chromium and taurine.

Keywords: parenteral nutrition; critical illness; dietary supplements; terminally ill

Puntos clave

El FV es una compleja situación que implica un pronóstico irreversible para una patología, que finaliza con el fallecimiento de la persona. Uno de los aspectos de interés, se centra en la NP, que ha mostrado una rápida evolución, desde su inicio, en su tecnología y formulación. En este sentido, la suplementación está adoptando un papel muy importante por su gran utilidad para atenuar las alteraciones propias del FV y evitar nuevas complicaciones.

Introducción

El FV implica la existencia de un pronóstico irreversible que conlleva con el fallecimiento. En algunas circunstancias, es una enfermedad terminal la responsable del FV, y que considerando los criterios de la Sociedad Española de Cuidados Paliativos (SECPAL), dicha enfermedad se caracteriza, por ser una enfermedad incurable, con pronóstico de vida no superior a 6 meses y en la que se presenta una multifactorialidad de sintomatología variada y cambiante^(1,2).

Son numerosos los recursos, que ofrece el desarrollo científico y tecnológico, por los cuales se puede llegar al FV con unos adecuados cuidados que garanticen un óptimo estado de confort. Por tanto, se debe considerar que el auge de la ciencia médica es fundamental para aliviar a las personas que se hallan en el FV cuando ya no es posible curar, ofreciéndoles recursos que garanticen morir con dignidad; entendiéndose esta expresión como un proceso basado en el alivio de dolor, y fundamentado en la libertad de decisión individual⁽²⁾.

El abordaje del FV es multifactorial y está condicionado por multitud de circunstancias que, en gran número de ocasiones, generan grandes cuestiones que se enmarcan en el campo de los dilemas bioéticos. Uno de los aspectos de interés relacionados con ese final se centra en el tratamiento nutricional en cualquiera de sus modalidades, incluida la NP, que puedan requerir las personas afectadas, entendiéndose como un cuidado básico y no como un tratamiento, pues en este último caso podría tener un carácter renunciabile por el paciente y precisamente, lo que se pretende analizar en el presente trabajo es la importancia y/o mejora que puede aportar la NP suplementada^(3,4).

En el abordaje de la NP suplementada se disponen de numerosos recursos que permiten aliviar a las personas cuando ya no es posible curarlas. El soporte nutricional (que puede administrarse por vía oral, enteral o parenteral) tiene bastante importancia y forma parte de los distintos cuidados paliativos que deben proporcionarse a los enfermos con objeto de mejorar su calidad de vida, en un periodo que puede abarcar seis meses, pero que dependiendo de la evolución y progreso de su patología puede ser mucho más corto^(4,5).

Actualmente, la NP ha mostrado una rápida evolución desde sus inicios, generando una innovación en su tecnología y formulación, donde los suplementos nutricionales están adoptando una importancia fisiológica muy útil. No obstante, la NP debe combinar aspectos farmacéuticos y nutricionales para garantizar que el suplemento adicionado no sea un inconveniente y/o que afecte a la y estabilidad de la NP^(6,7,8).

Por tanto, el presente trabajo de revisión bibliográfica narrativa tiene por objeto analizar las consideraciones nutricionales y tecnológicas de la NP suplementada, así como sus posibles beneficios para mejorar y/o paliar algunos síntomas propios del FV.

Métodos

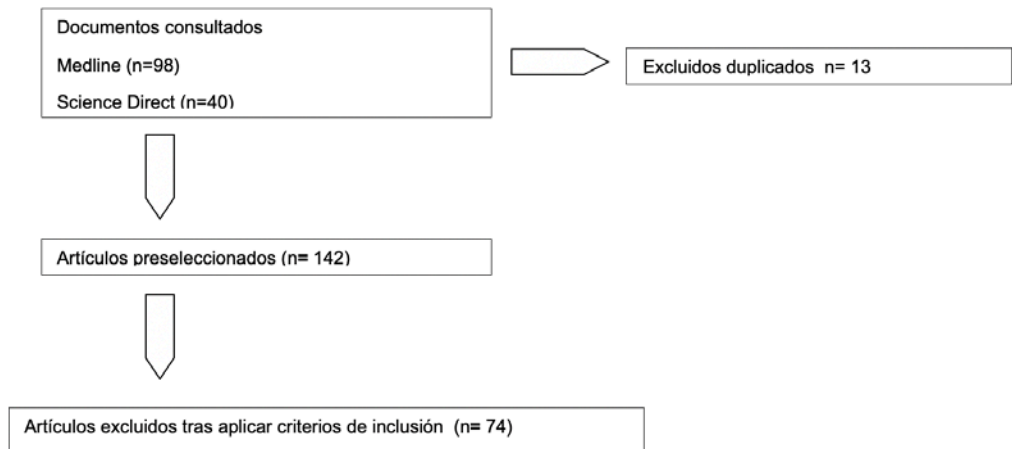
Se realizó una revisión bibliográfica narrativa basada en la búsqueda en distintas bases de datos tales como Medline, Science Direct y Scopus de todos los artículos publicados hasta marzo de 2021. Para obtener la información se han empleado las palabras claves “parenteral nutrition and end of life”, “supplemented parenteral nutrition”, “supplemented parenteral nutrition and end of life”, “supplemented parenteral nutrition and critical disease”, “parenteral nutrition and trace elements”, “end of life and

nutrition care”, “glutamine and parenteral nutrition”, “taurine and parenteral nutrition”, “arginine and parenteral nutrition”, “citrulline and parenteral nutrition”.

Los filtros utilizados, en esta búsqueda, en las bases de datos, que así lo permitían, fueron estudios realizados en humanos y publicaciones en español e inglés. De los artículos seleccionados se excluyeron, de la revisión, aquellos que no cumplían con los siguientes criterios de inclusión: a) estudios realizados en humanos; b) publicaciones sobre suplementación nutricional orientada al FV.

Inicialmente se examinaron títulos y resúmenes de 155 artículos de los cuales 13 se encontraban duplicados por lo que se excluyeron. Posteriormente, se aplicaron los criterios de exclusión de los cuales quedaron 68 artículos. Además, se han consultado 3 libros y 2 páginas web de las cuales se obtuvieron 2 documentos de interés e incluidos.

Se incorporaron 2 documentos obtenidos de otras fuentes.



Resultados y discusión

Importancia de la NP en el FV.

La malnutrición es uno de los problemas más frecuentes en el FV⁽¹²⁾ que varía según el estado de la misma. Por ello, los criterios varían en función de últimos días u horas previos al fallecimiento. En este sentido, se hace necesario mencionar brevemente las etapas más críticas por las que se puede pasar antes de la muerte, donde coexisten alteraciones que imposibilitan la normal alimentación e hidratación y que serían susceptibles del uso de la NP:

a) Etapa previa al estado de agonía. Implica desde el diagnóstico de una situación irreversible hasta la etapa de agonía. La alimentación deberá adaptarse a los síntomas que puedan surgir. En este sentido, se puede utilizar la alimentación básica adaptada y los suplementos nutricionales. Todo ello, deberá contener una elevada densidad energética y un carácter hiperproteico, sin olvidar la importancia de una adecuada ingesta de vitaminas y minerales; de hecho un déficit de vitamina B₁₂ se asocia con un deterioro de la función neurológica y cognitiva. A todo lo anterior, se deberá considerar las recomendaciones dietéticas específicas para cada situación clínica concreta.

b) Agonía. Abarca los 3-5 días previos a la muerte, y en ella se observa un deterioro integral de las funciones vitales, tales como la disminución o anulación de las funciones digestivas, renal y mental que se acompañan de un elevado grado de incapacidad funcional⁽¹³⁾.

La hidratación no está indicada en el paciente moribundo pues podría incrementar los síntomas de la fase agónica. No obstante, hay otros posicionamientos que consideran lo contrario¹⁴. De hecho, mu-

chos dilemas éticos, en el proceso de decisión acerca de la NP en el FV, podrían evitarse si el paciente y la familia participan en las decisiones. También, el desarrollo de métodos para evaluar los efectos y beneficios de la NP resulta útil para ayudar a la toma de decisiones de los profesionales sanitarios⁽¹⁴⁾.

Se hace necesario destacar que el FV, provocado por una enfermedad terminal u otra circunstancia, se corresponde con un estado crítico en el cual se producen una serie de alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos (Tabla 1) como respuesta metabólica al estrés que genera el estado crítico, que lleva asociado una situación de hipermetabolismo que pretende sostener las funciones vitales, la respuesta inflamatoria, la función inmunológica y la reparación tisular⁽¹⁵⁾.

Tabla 1. Alteraciones metabólicas de macronutrientes en la ET y sus consecuencias^(16,17,18,19).

Hidratos de carbono	Proteínas	Lípidos
-Aumento de catabolismo, neoglucoogénesis y resistencia periférica a la insulina. Hiperglucemia Hiperlactatemia	-Gluconeogénesis Hipoalbuminemia. Catabolismo proteico -Reducción de eliminación de nitrógeno	-Aumento lipólisis -Deficiencia de ácidos grasos de cadena larga

La NP se debe orientar para aliviar, en lo posible, el sufrimiento físico y emocional. De ahí que, la actuación debe ser valorada individualmente, para conocer su repercusión sobre la calidad de vida del paciente⁽²⁰⁾. El objeto de la NP es paliar la desnutrición existente, siendo uno de los principales problemas la caquexia, que aparte de ser un factor de mortalidad, puede relacionarse con depresión, ansiedad y deterioro de la calidad de vida⁽²¹⁾.

En la presente revisión bibliográfica, cuando se menciona NP se engloba a la total, es decir aquella donde los requerimientos nutricionales del paciente son administrados por vía intravenosa y que se caracteriza por: a) aportar todos los nutrientes necesarios; b) requiere el uso de vía central (vena subclavia o yugular,) accesos periféricos que desemboquen en estas venas; c) admitir soluciones hipertónicas (osmolaridad alta>900 mOsm/l); d) administrar prolongadamente (semanas o meses). No obstante, la NP no está exenta de complicaciones, especialmente las metabólicas, que deben considerarse para su suplementación (Tabla 2)^(22,23,24,25).

Tabla 2. Complicaciones metabólicas de la NP.

Hiperglucemia	Aumenta el riesgo de mortalidad y hospitalización
Hipoglucemia	Hospitalización y mortalidad por desajustes entre dextrosa e insulina.
Hipertrigliceridemia	Incremento del riesgo de pancreatitis y alteraciones en el funcionamiento pulmonar.

Componentes de la NP: Generalidades de interés en el FV.

Existen numerosos posicionamientos sobre la utilidad de la NP suplementada en el FV tales como: a) contribuir a la calidad de vida del enfermo por su carácter emocional positivo⁽²⁶⁾, b) reducir la inflamación pulmonar debido a un incremento de Inmunoglobulina A⁽²⁷⁾, c) mantener la masa muscular debido a el incremento de la función mitocondrial⁽²⁸⁾, d) mejorar la función inmunitaria por incremento de los linfocitos Th2 de carácter antiinflamatorio⁽²⁸⁾, e) atenuar el estrés oxidativo ya que baja la respuesta inflamatoria⁽²⁸⁾ y f) minimizar el estado catabólico a largo tiempo⁽²⁹⁾.

Una vez enumerados los beneficios de la NP, se hace necesario abordar los distintos componentes que suelen integrar la NP de utilidad en el FV^(30,31):

A) Hidratos de carbono. Constituyen la principal fuente energía, y se requiere un aporte de 4-5 g/kg peso/día. Pueden incorporarse alguno de los siguientes tipos:

A.1. Soluciones de glucosa. Determinan la osmolaridad de la solución y pueden utilizarse en formato de glucosa anhidra o monohidratada. La glucosa es el hidrato de carbono de uso preferente, por su utilidad y bajo coste. Se debe vigilar que la osmolaridad no supere los 1000 Osm/L. Son muy estables tras su esterilización en autoclave.

A.2. Soluciones de glicerol. El glicerol es menos utilizado, excepto en aquellas situaciones donde se pretende una menor respuesta insulínica o que exista una hiperglucemia por estrés de difícil control. Se debe vigilar la NP suplementada que use glicerol ya que un exceso del mismo puede provocar problemas de hemólisis.

A.3. Polioles. Son menos usados debido a las controversias que genera la posible mezcla integrada, además de la glucosa por fructosa, xilitol, sorbitol y glicerol dada su relación con procesos de acidosis láctica.

B) Aminoácidos (Aa). Se usan Aa esenciales y no esenciales en forma de soluciones cristalinas comerciales (Aminosyn II[®], Clinisol[®], Freamine[®], Phosol[®]). Los requerimientos proteicos diarios dependerán del grado de estrés metabólico, pudiendo oscilar entre 1-2g/kg peso/día. Con respecto a la administración de los Aa, algunos suelen aportarse como precursores para incrementar su solubilidad en la NP como es el caso de tirosina y cisteína. Otros, son administrados como dipéptidos (glutamina, tirosina) para mejorar la estabilidad y solubilidad de la fórmula. Se ha observado que la utilización de soluciones enriquecidas en Aa de cadena ramificada, genera controversia ya que se carece de un consenso en su utilización como sustrato energético, así como para incrementar la síntesis y el recambio proteico. No obstante, en casos graves hay que modificar los Aa administrados para controlar adecuadamente aquellos aspectos que puedan provocar un incremento de los Aa de carácter aromático y su alteración del estado mental⁽³²⁾.

C) Lípidos. Son responsables del descenso de la osmolaridad de la mezcla. La aportación de los lípidos en forma de emulsión O/W, tiene función energética y una potencial modulación positiva de la respuesta inflamatoria por lo que se requieren 1,5-2,5 g/kg peso/día. Los lípidos se incorporan a la NP mediante la administración de ácidos grasos esenciales en forma de triglicéridos (TG). Con respecto a los ácidos grasos utilizados, pueden ser de cadena larga (procedentes de aceite de soja, cártamo o girasol) que suelen ser más inestables y de fácil peroxidación lipídica, o mezclas de cadena larga y corta al 50% que han mostrado más estabilidad, menores complicaciones hepáticas y mejor balance nitrogenado. También, se ha observado que en estas emulsiones los tocoferoles se vehiculizan con las grasas (protección frente al daño oxidativo celular) y vitamina K (compatible con aceite de oliva o soja). Es importante destacar el papel positivo de la vitamina D en la función inmunitaria de pacientes con COVID-19 y por tanto, la necesidad de suplementación de las formulaciones de NP en aquellas personas que presentan déficit⁽³³⁾. Los lípidos se utilizan en forma de emulsión lipídica, y para su estabilización se requieren emulgentes (lecitina de huevo), isotonzantes (glicerol) y estabilizantes (oleato sódico) con objeto de que las gotículas lipídicas que se formen sean similares a los quilomicrones humanos, pero con distintos tipos de ácidos grasos, menos colesterol, sin apoproteínas y con más fosfolípidos⁽³²⁾.

Entre las emulsiones lipídicas comerciales, más frecuentes, se encuentran Intralipid[®] (aceite de soja), Nutralipid[®] (aceite de oliva al 80% y aceite de soja al 20%), Clinolipid[®] (aceite de oliva 80%, aceite de soja 20%, SOLE[®] (aceite de soja), SMO Lipid[®] (aceite de oliva, de pescado, soja y triglicéridos de cadena media) y Omegaven[®] (aceite de pescado). En situaciones críticas, se han observado distintos efectos, por parte de SOLE[®] tales como descenso de la sepsis, del ratio de linfocitos T helper y T supresores, así como el papel de las mezclas de triglicéridos cadena larga/corta en el aumento de albúmina, EPA y DHA⁽³⁴⁾.

D) Electrolitos. Los requerimientos basales de electrolitos por NP son 1-2 mEq/kg/día de sodio y potasio, 10-15 mEq/día de calcio, 8-20 mEq/día de magnesio y 20-40 mmol/día de fosfato para mantener el equilibrio ácido-base. No obstante, hay que valorar el estado nutricional en el FV, así como las pérdidas de nutrientes, que puedan producirse, para determinar sus requerimientos diarios. Se usan preparados de electrolitos aislados que incluyen sodio, potasio, calcio, cloro, magnesio y fósforo. En este sentido, el modo y momento de su incorporación a la NP pueden condicionar la estabilidad de la formulación.

E) Vitaminas. Se incluyen vitaminas liposolubles (A, D, E, K) e hidrosolubles (B₁, B₂, B₆, B₉, B₁₂). Es frecuente tener que adicionar suplementos en función de las necesidades recomendadas y requerimientos de la persona enferma⁽³¹⁾.

F) Oligoelementos. En este grupo se integran cobre, cobalto, cromo, flúor, yodo, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y zinc. Su carencia se asocia a diversas anormalidades funcionales y estructurales, debido a que los oligoelementos desempeñan un importante papel como cofactores enzimáticos. Actualmente, no es posible individualizar la prescripción de oligoelementos, sino que existen preparados de oligoelementos⁽³¹⁾.

G) Fármacos. La adición de medicamentos a la NP debería evitarse en la medida de lo posible. No obstante, existen casos en los que son útiles, por lo que en la bolsa de NP solo se pueden adicionar fármacos siempre que no se degraden, no desestabilicen la emulsión lipídica y la farmacocinética sea adecuada durante la administración. En este sentido, algunos de los fármacos más utilizados en NP⁽³⁵⁾ incluyen: a) La insulina, necesaria en situaciones de hiperglucemia en pacientes con diabetes preexistente o en hiperglucemia por estrés; b) antihistamínicos H2 (ranitidina y famotidina) que suelen ser más estables si la NP incluye lípidos; c) octreotida y somatostatina, cuya estabilidad se reduce a 24-48 horas en la bolsa de NP por lo que periodos más prolongados cursan con adherencia a la bolsa y por tanto, el descenso de la biodisponibilidad⁽³⁶⁾; d) heparina, cuya adición a la NP genera controversia por el balance riesgo-beneficio pues aunque disminuye el riesgo de tromboflebitis en personas sometidas a NP, también hay que vigilar la interacción que se puede desarrollar entre las cargas negativas y positivas de la heparina con el calcio de las gotículas de grasa, lo que puede cursar con una desestabilización y separación de las fases de la emulsión de la NP⁽³⁷⁾. Con respecto a fármacos y NP no se puede obviar que hay que evitar la administración de dos o más fármacos conjuntamente.

H) Agua. Se usa agua esterilizada para inyectables añadiéndose la cantidad justa para el volumen final de la mezcla. Se requiere que la cantidad diaria de agua oscile entre 30-40 mL/kg peso/día.

Todos los componentes de la NP suplementada, descritos anteriormente, pueden administrarse mediante mezcla binaria (un espacio compartido con hidratos de carbono, Aa y micronutrientes más otro espacio con aporte grasa) lo que se denomina una bolsa bicameral, o por una mezcla ternaria donde todos los componentes se hallan en una única bolsa, que presenta una serie de ventajas tales como fácil administración, reducción de complicaciones por infecciones, descenso de la osmolaridad de la solución y por tanto, menor riesgo de padecer tromboflebitis, así como un mayor cumplimiento terapéutico en el caso de NP domiciliaria, menor tiempo de perfusión y mayor tolerancia venosa por isotonicidad, entre otros⁽³⁸⁾.

NP suplementada. Compuestos de interés.

La NP suplementada implica la adición de nutrientes, en formulaciones estándar o individualizadas, según las necesidades de los pacientes. En este sentido, no debe obviarse que la suplementación vitamínica puede ser limitada y que el uso de minerales solo debe establecerse cuando las condiciones clínicas lo aconsejen.

Así, en el FV, sería útil la adición de suplementos cuando, tras una monitorización y evaluación del paciente, se detecte: a) un requerimiento aumentado de algunos nutrientes; b) pérdidas de nutrientes; c) fallos en la utilización de nutrientes; d) interacciones fármaco-nutriente; e) mejora de la calidad de vida en la situación patológica. En este sentido, existen numerosos nutrientes y compuestos de interés que pueden utilizarse en NP, por lo que resulta útil destacar sus implicaciones nutricionales y tecnológicas:

A) Glutamina

En pacientes críticos, la glutamina (Glu) actúa como sustrato energético para la gluconeogénesis, síntesis proteica y para las células del sistema defensivo. Está indicada para reducir la incidencia de infecciones y la restauración linfocitaria. Se administra como dipéptidos de L-alanil-L-glutamina y Glicil-L-glutamina. Se debe vigilar su suplementación excesiva ya que puede afectar al sistema renal, hepático y sistema nervioso central⁽³⁰⁾.

Las situaciones críticas provocan un descenso de los niveles de Glu en el organismo, asociándose con mortalidad por lo que, aunque pueda sintetizarse por el organismo, es necesario aportarla ya que cumple con una función como protector tisular, regulador de la función inmunitaria e inflamatoria, atenuar la acción antioxidante y protección del metabolismo en situaciones de estrés metabólico⁽³⁹⁾.

Existe controversia con respecto a su uso en NP para casos de insuficiencia hepática aguda, insuficiencia renal y traumatismo craneoencefálico, pero si se aconseja dicha suplementación en situaciones de septicemia, isquemia miocárdica crítica y neurocríticos, ya que se ha observado una reducción significativa de las complicaciones infecciosas y metabólicas, así como mortalidad⁽⁴⁰⁾.

Actualmente, los estudios más recientes muestran discrepancias en el uso de la Glu y parte de ellos concluyen que, aunque la suplementación haya sido recomendada en guías de sociedades internacionales, también existen datos que no aconsejan su uso indiscriminado en pacientes críticos ya que no existe una adecuada relación beneficio/riesgo. Por tanto, los estudios recientes no muestran que la suplementación con Glu y antioxidantes sea eficaz y tolerada por los pacientes en estado crítico^(41,42). A pesar de todo ello, hay estudios que constatan una reducción de la resistencia a la insulina y la mortalidad en los seis meses en pacientes que habían recibido NP suplementada con Glu^(43,44).

B) Arginina

La arginina (Arg) es un Aa no esencial, sin embargo, se considera, condicionalmente esencial cuando la disponibilidad de Arg endógena sea insuficiente para satisfacer las demandas metabólicas⁽³⁰⁾. Los estudios que relacionan Arg con NP en estado crítico han mostrado que: a) personas con pre y post cirugía presentan datos clínicos más favorables⁽⁴⁵⁾; b) no existen datos de inmunotoxicidad en formulaciones con L-arginina⁽⁴⁶⁾; c) existe seguridad de la administración de Arg por vía enteral o parenteral⁽⁴⁷⁾; d) la suplementación reduce la mortalidad y complicaciones debido a su capacidad para estimular la síntesis de hormonas (insulina, glucagón y catecolaminas), aspecto útil donde hay un elevado catabolismo⁽⁴⁸⁾.

C) Taurina

La taurina (Tau) es un Aa no proteico muy útil para los pacientes sometidos a NP domiciliaria ya que en el FV, los niveles plasmáticos suelen ser bajos, por lo que la suplementación resulta muy necesaria para provocar efectos positivos en el sistema cardiovascular, neuroprotección, protección visual y osmoregulación, así como una acción antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora⁽⁴⁹⁾.

D) Citrulina

El interés de la citrulina (Citr) en el campo de la nutrición clínica es relativamente reciente. Con independencia de sus propiedades antioxidantes, es clave fundamental en la homeostasis de la síntesis de proteínas y del metabolismo del óxido nítrico. No obstante, en la actualidad no hay indicaciones claras ni evidencias científicas sobre su beneficio en el FV⁽⁴⁹⁾.

F) Lípidos

Los lípidos muestran un especial interés por su uso como vehículos de vitaminas liposolubles. No obstante, la literatura científica ha evidenciado que: a) la NP suplementada reduce el riesgo de infección y sepsis entre el 40% y 56%, respectivamente, y que la duración de la estancia, tanto en la unidad de cuidados intensivos como en el hospital, se reduce, aproximadamente en dos días⁽⁵⁰⁾; b) la inclusión de aceite de oliva y aceite de soja, triglicéridos de cadena media, aceite de oliva y aceite de pescado, pueden ser una alternativa viable para la NP, sin embargo, algunos ensayos clínicos han planteado dudas sobre los beneficios nutricionales⁽⁵⁰⁾.

G) Electrolitos

Los electrolitos (cloruro, fosfato, acetato, sodio y potasio) tienen un papel fundamental en la regulación de muchos procesos fisiológicos. No existe un patrón estándar que obligue a dicha suplementación, sino que deberá considerarse el beneficio/riesgo en función de las condiciones fisiológicas en el FV⁽³¹⁾.

No obstante, es útil realizar algunas consideraciones con respecto a los electrolitos tales como:

1. Las deficiencias de sodio suelen ir añadidas a las pérdidas de agua corporal del paciente; de ahí que, la suplementación deberá considerarse con respecto a su balance hídrico⁽⁵¹⁾.
2. Debe vigilarse el ritmo de infusión del potasio para evitar una potencial parada cardíaca por una excesiva velocidad de administración⁽⁵¹⁾.
3. Se valorará la suplementación de magnesio como sulfato de magnesio para pacientes con desnutrición y sometidos a NP total durante periodos prolongados⁽⁵²⁾.
4. La suplementación de fosfato debe ser suficiente para restaurar el déficit de fosfato intracelular y compensar la caída de fosfato plasmático en el FV que curse con desnutrición, hiperglucemia y/o insuficiencia renal⁽⁵³⁾.

H) Elementos traza

Los elementos traza juegan un importante papel en la NP pero no deben utilizarse con carácter rutinario sin previa valoración clínica⁽³¹⁾, de hecho, tanto su deficiencia como exceso pueden ser constitutivos de toxicidad y ausencia de nutrientes necesarios que implicarían la génesis de diversas patologías y alteraciones fisiológicas tal y como se describen en la tabla 3:

Tabla 3. Alteraciones asociadas a deficiencias de elementos traza⁽⁵⁴⁾.

Elemento traza	Problemas relacionados con deficiencia en NP
Selenio	Cardiomiopatía, macrocitosis, debilidad muscular, pigmentación piel y pelo.
Zinc	Diarrea, alopecia, estomatitis, glositis, úlceras perianales, enteropatías, neutropenia, problemas del sistema inmune. Útil la suplementación en casos de sepsis e hipermetabolismo.
Cobre	Anemia, neutropenia, trombocitopenia, pancitopenia, destrucción ósea, mieloneuropatía. Hay que vigilar la posible toxicidad ya que pueden producirse casos de disfunción hepática y colestasis, de hecho, si existen estas patologías, se debe suprimir la suplementación. La suplementación se administra mediante la formación de complejos con Aa.
Manganeso	La deficiencia no suele generar problemas, sino la toxicidad asociada por una suplementación innecesaria que se relaciona con problemas tales como dolor de cabeza, disartría, distonía, neuropatía periférica.
Cromo	No es habitual deficiencias en NP aunque si existen se relacionan con anomalías del metabolismo de la glucosa, de ahí, la importancia de monitorizar adecuadamente en caso de suplementación necesaria. Vigilar la suplementación en casos de insuficiencia renal.
Hierro	Se ha observado que su deficiencia, en pacientes sometidos a NP, provoca anemia.
Molibdeno	La mayoría de las formulaciones de NP tienen molibdeno en su composición y no se han descrito efectos.
Iodo	No se observan deficiencias que obliguen a su incorporación y suplementación en NP.

Los elementos traza, más utilizados en la NP suplementada, y sus principales consideraciones, se describen a continuación:

A) Zinc. Se puede suplementar por vía intravenosa, enteral u oral, aunque su absorción dependerá de la forma de administración. Así, los complejos de zinc se unen a aspartato, cisteína, histidina o metionina para una mayor absorción⁽⁵⁵⁾.

B) Selenio. Es un oligoelemento con acciones antioxidantes, antiinflamatorias e inmunológicas, por lo que se recomienda adicionar selenio de forma rutinaria a todas las soluciones de NP. Aunque se han realizado estudios para evaluar los beneficios de la suplementación, las diferencias se asocian a la vía de suplementación (parenteral vs enteral), dosis diaria de selenio (dosis alta vs dosis baja), uso de un bolo de carga, selección del paciente (sépticos y no sépticos) y la suplementación de otros antioxidantes (monoterapia vs cócteles antioxidantes). Se ha determinado que tiene un efecto beneficioso en la formación de selenoproteínas con acción antioxidante frente los radicales libres que se forman como consecuencia del estado de metabólico en el FV⁽⁵⁶⁾.

C) Cromo. Promueve las acciones de la insulina, mejora su actividad en el tejido periférico y reduce los requisitos de insulina. Se ha descubierto que los pacientes que reciben NP no suplementada con cromo presentan deficiencia de este elemento traza. Sin embargo, su administración provoca un mejor control de la glucosa, aspecto útil en la hiperglucemia. Actualmente, no se han descrito casos de toxicidad por cromo en NP⁽⁵¹⁾.

D) Coenzima Q. Puede ser un interesante suplemento, del cual se requieren más estudios, y cuya interacción sinérgica con el selenio muestra beneficios para el suministro de energía celular así como antioxidante. La solubilidad de la coenzima puede afectarse por variaciones del pH⁽⁵⁷⁾.

E) Vitaminas. Los pacientes críticos cursan con una serie de deficiencias vitamínicas que obligan a su suplementación, así se administran como complemento comercial multivitamínico integrado por Vitamina C, A, E, K y del complejo B (B₁, B₂, B₃, B₆, B₇, B₁₂)⁽³¹⁾.

Consideraciones tecnológicas de la NP suplementada.

La NP suplementada requiere de la participación indispensable de la tecnología farmacéutica para garantizar que los componentes presenten la estabilidad requerida para su óptima administración y utilización por el organismo. Se describen por grupos, los principales aspectos a considerar:

- Aminoácidos.

Los Aa tienen unas funciones tecnológicas definidas tales como prevenir la inestabilidad de emulsiones; evitar la precipitación de calcio y oligoelementos; actuar de amortiguadores cuando el pH es bajo y alterar las emulsiones; potenciar la acción de los emulgentes por parte de los Aa básicos, y disminuir el efecto estabilizante de las emulsiones⁽³²⁾.

Existen una serie de aspectos que pueden afectar a los Aa de la NP suplementada, y por tanto a la estabilidad de las emulsiones tales como la concentración de oxígeno (provoca oxidación de los mismos); bisulfito sódico (degrada el triptófano); pH < 4 (hidrólisis de prolina e histidina) y la presencia de cobre (generación de precipitación de sulfuro de cobre). No obstante, el pH y la concentración de Aa básicos condicionarán la estabilidad⁽⁶⁾.

- Vitaminas.

Los factores que pueden afectarlas y por tanto, generar inconvenientes tecnológicos en el desarrollo de la NP suplementada incluyen la fotólisis (por luz ultravioleta y fluorescente), adsorción en la bolsa y reacciones de óxido-reducción; todo ello, acelerado por un incremento del pH, temperatura y la presencia de cobre y bisulfito sódico.

Concretamente, se ha observado una inactivación de la vitamina C en presencia de cobre y oxígeno, mientras que las vitaminas B₁, B₉, B₆ se inactivan en presencia de hierro; también es destacable, que un pH alcalino inactiva las vitaminas hidrosolubles y la vitamina A. Otras interacciones se han producido entre la combinación de vitamina K y B₁₂, con pérdida de esta última.

Adopta una especial relevancia el papel de la luz y los oligoelementos en la degradación de las vitaminas liposolubles por fotoperoxidación generando la destrucción de las vitaminas y la génesis de radicales que pueden agravar el estado de la enfermedad^(59,60).

También, se ha comprobado que una suplementación excesiva con vitaminas A, D, E y K puede provocar acumulación y toxicidad que se relaciona con problemas de fallo renal. El tipo de bolsa de la NP suplementada adopta un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad de las vitaminas C, A y E garantizando su fotoprotección y no adsorción a la bolsa⁽⁶¹⁾. No obstante, en la bolsa hay vitaminas que merecen especial atención en relación con su estabilidad:

a) Vitamina C. Puede sufrir procesos quelantes, debidos al contenido en cisteína del Aa, y oxidativos por parte de la permeabilidad del oxígeno de la bolsa. De interés, resultan los procesos degradativos que pueden desarrollarse por el incremento de la temperatura⁽⁶¹⁾; b) Vitamina A. Sufre procesos degradativos por fotoperoxidación, lo cual implica la necesidad de fotoprotección de la bolsa. Existen discrepancias con respecto a la adsorción de dicha vitamina al PVC de las bolsas de NP, lo cual podría influir en la velocidad de absorción⁽⁶²⁾; c) Vitamina E. Presenta una mayor estabilidad cuando se pro-

tege de la luz y refrigeración; d) Vitaminas del grupo B. La estabilidad depende de la fotoprotección, la temperatura y las condiciones de almacenamiento. Como aspectos especiales se tiene que la mayor estabilidad del ácido fólico se asocia a las bolsas de PVC y que la vitamina B₁ tiene mayor estabilidad en ausencia de bisulfitos en la solución de Aa. Por otro lado, la refrigeración otorga mayor estabilidad a la vitamina B₁₂⁽⁶²⁾.

- Oligoelementos.

Con carácter general, no es habitual la deficiencia de oligoelementos en personas sometidas a NP en el FV pero si puede haber determinadas circunstancias donde pueden observarse deficiencias motivadas por un incremento en la excreción de los oligoelementos o por un bajo aporte de la NP. Así, un periodo prolongado con NP puede relacionarse con un bajo aporte de cobre y manganeso⁽³¹⁾. Los oligoelementos están implicados en la floculación de lípidos, catalización de reacciones de óxido-reducción, degradación de vitaminas y formación de complejos con Aa. Así, el pH puede afectar ya que, si es superior a 5´5, se generan precipitados como dihidróxidos. También, es frecuente la precipitación de calcio y zinc mediante la génesis de sulfuros metálicos insolubles⁽⁶²⁾. Hay que considerar que durante la elaboración de la NP suplementada puede producirse contaminación por aluminio, que no debe superar los 25 mg/L, ya que se asocia a toxicidad y riesgo de encefalopatía hepática, anemia microcítica y osteomalacia⁽³¹⁾.

Con respecto a los oligoelementos y vitaminas hay que indicar que son incompatibles entre sí en la NP, ya que comprometería su estabilidad, y que por tanto debería incluirse en fórmulas de días alternos.

- Emulsiones.

Las emulsiones usadas en NP, de carácter O/W, son inestables por naturaleza ya que los glóbulos de grasa tienden a unirse provocando una separación de fases y una destrucción de la emulsión. De ahí, la importancia de los emulgentes (fosfolípidos, glicerol, lisoderivados de la lecitina) como herramientas para descender la tensión superficial y aportar carga negativa. Todo ello, contribuye a una ausencia de unión entre los glóbulos grasos debido a la mayor repulsión electrostática entre ellos, es decir se debe procurar que el tamaño de esas partículas lipídicas sean lo más semejante posible a los quilomicros. No obstante, se citarán los distintos aspectos que pueden desestabilizar la emulsión de la NP suplementada:

- El potencial Z es el elemento que determina la estabilidad y el tamaño de las partículas de la emulsión. El descenso del potencial Z por debajo de -1,5 mV provocaría un descenso de esa repulsión electrostática, provocándose fenómenos de floculación, cremación, coalescencia e inversión de fases, que desembocarían en la unión de los glóbulos de grasa lo que inestabiliza la emulsión⁽⁶³⁾.
- Emulsiones con ausencia de mezclas lipídicas suelen mostrar un incremento de glóbulos de tamaño superior a 1 micra⁽⁶¹⁾.
- pH < 5 provoca una neutralización eléctrica del emulgente desapareciendo las fuerzas repulsivas y agregación de glóbulos. Por ello, se debe garantizar un pH > 5 y vigilar que el tiempo de conservación no sea muy elevado, y los procesos de esterilización por calor ya que suelen liberar gran cantidad de ácidos grasos libres que descienden el pH. También, el descenso de este pH puede motivar precipitaciones por parte de los electrolitos. Tienen mención especial las soluciones de Aa por su capacidad tamponante y tensioactiva, de ahí, la importancia de adicionarlas al final de la mezcla⁽⁶⁴⁾.
- La presencia de electrolitos y oligoelementos, especialmente los cationes di y trivalentes, neutralizan la carga negativa de glóbulos lipídicos generando procesos de floculación (divalentes) y agregación (trivalentes). No obstante, los aniones han mostrado un efecto protector de las emulsiones⁽⁶⁵⁾.
- La incorporación de medicamentos ácidos afectan a la estabilidad⁽⁶⁶⁾.
- Baja concentración de Aa que impide el adecuado efecto tampón⁽⁶⁴⁾.

- El aporte de glucosa, en concentración no muy elevada, puede relacionarse con un incremento del diámetro de las gotículas grasas⁽⁶⁵⁾.
- Los TG de cadena larga han mostrado una menor estabilidad frente a mezclas de triglicéridos⁽⁶³⁾.
- En el orden de mezclado, las emulsiones deben adicionarse en último momento a la formulación para obtener el mínimo porcentaje de glóbulos con tamaño superior a 5 μ , y así evitar la formación de precipitados⁽³⁸⁾. En este sentido, un adecuado orden de adición está integrado por la siguiente secuencia: Aa+fosfato+electrolitos-glucosa+oligoelementos+vitaminas+calcio----lípidos, que evita la formación de precipitados⁽⁶⁷⁾.
- Un elevado tiempo de almacenamiento (superior a 48 horas) provoca la formación de precipitados cristalinos que afectan a la emulsión y su estabilidad⁽⁶⁸⁾.
- La adición de un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados, unido a una adecuada refrigeración y protección de la luz evita fenómenos de peroxidación lipídica que afecta a la estabilidad.
- Cuando la relación entre Aa básicos y ácidos es superior a 1,5 se ejerce un efecto protector de emulsiones lipídicas dependientes de pH⁽³⁸⁾.
- El uso de lecitinas hidrolizadas (lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletabolamina) como emulgentes consiguen estabilizar las emulsiones al bajar el potencial Z.

Atendiendo a lo anteriormente descrito, surge una cuestión ¿cómo se puede estabilizar adecuadamente una emulsión para garantizar su vida útil en las bolsas de NP suplementada? Aunque la respuesta es compleja, hay que considerar todas las circunstancias que propicien un descenso del potencial Z tales como: a) la estabilización de la capa fosfolípidos para garantizar que el tiempo de coalescencia sea mayor que el de vida útil previsto; b) la estabilización con lecitina para aumentar los valores de pH y conseguir una menor repulsión electrostática; c) incremento de la concentración de la solución de electrolitos para descender el potencial Z; d) la adición de glucosa; e) el uso de surfactantes iónicos; f) un incremento de la temperatura degrada los fosfolípidos y lisoderivados aumentando la carga interfacial y estabilidad; g) una adecuada preemulsificación previa a la unión de la fase acuosa y oleosa; h) vigilar el tamaño de partícula⁽³⁴⁾.

• Fluidos.

La administración diaria de NP puede provocar cambios en la composición corporal del agua y electrolitos, por lo que dicha pérdida debe ser vigilada y controlada, tanto en su volumen como en el contenido, para evitar una osmolaridad elevada en la NP suplementada que, indicada para un tiempo inferior a 14 días, no debe superar 900 mOsm/L para evitar trombosis, tromboflebitis y extravasación^(31,58).

Si por el contrario, el tiempo prescrito para la NP supera los 14 días, aunque se pueda alcanzar una osmolaridad superior a 1000 mOsm/L, hay que reducir la hipertonicidad de la NP suplementada tras su administración en la vena cava, para evitar daños vasculares. Por ello, se deberá establecer una formulación adecuada a situaciones clínicas posibles tales como hiperglucemia, azotemia, hipernatremia, hipocalcemia, acidosis y alcalosis metabólica e hipofosfatemia, así como a una vigilancia sobre la evolución del paciente, especialmente sobre todo para aquellas formulaciones hiperosmolares que implican un riesgo de extravasación y flebitis⁽⁶⁹⁾.

• Tamaño de partículas.

El tamaño de las partículas es un aspecto que debe controlarse y monitorizarse en la tecnología de la NP suplementada, ya que tamaños superiores a 5 μ m en una proporción superior al 0,4% de las partículas, origina que queden atrapadas en el pulmón provocando embolias y cambios en el pH sanguíneo, mientras que las de un tamaño inferior pueden llegar a quedar retenidas en hígado, bazo y riñón. En el caso de las partículas lipídicas, cuyos tamaños están comprendidos entre 600-1000 nm pueden generar embolismo, así como coalescencia y cracking⁽⁵⁸⁾.

Existen estudios de cromatografía por HPLC de mezclas de NP donde se ha determinado la relación existente entre el tamaño de partícula y la estabilidad de las emulsiones lipídicas tras 72 horas, a diferentes temperaturas (4 °C, 25°C, 37 °C), y con un diámetro comprendido entre 0,4-1 micras⁽⁷⁰⁾.

- Precipitación calcio-fosfato.

Uno de los aspectos más importantes en la estabilidad de las formulaciones de la NP suplementada es la precipitación de calcio y fosfato que está determinada por: a) un incremento del pH que genera más fosfato dibásico; b) un incremento de la temperatura que provoca una disociación del calcio; c) las concentraciones de calcio, magnesio y fosfato; d) una baja concentración de Aa; e) el orden de adición en la mezcla; f) el tiempo de conservación; g) las condiciones de administración (velocidad de perfusión y temperatura ambiental); h) el uso de fosfato diácido; i) un incremento de la concentración de calcio divalente; j) la elevada concentración de Aa ricos en fosfato y de gluconato; k) la baja concentración de dextrosa^(67,30,71).

Las interacciones entre calcio-fosfato, que generan precipitaciones, pueden reaccionar con iones bicarbonatos generando también precipitados de carbonato cálcico y carbonato magnésico insoluble. Por ello, se necesita la construcción de perfiles de solubilidad y ecuaciones matemáticas que ajusten las concentraciones de calcio y fosfato para evitar las reacciones de precipitación. Las precipitaciones, no solo implican una alteración fisicoquímica, sino que se asocian a toxicidad (distres respiratorio, embolia, neumonitis intersticial) y a la pérdida de la actividad de los fármacos que lleven asociados. Así, la presencia de minerales divalentes y trivalentes forma complejos con tetraciclinas, ciprofloxacino y el oxalato procedente de la vitamina C que puede interaccionar con calcio generándose precipitados^(31,38,72,73).

Conclusiones

Los estudios, que integran la presente revisión, muestran que la NP suplementada, previa valoración y monitorización de la persona enferma, puede ser útil en el FV siempre que proporcione los adecuados requerimientos de nutrientes y garantice un bienestar físico y/o psíquico.

Se han descrito acciones beneficiosas tras la suplementación de NP con zinc, selenio, cromo y taurina, mientras que la adición de glutamina, citrulina y arginina como suplementos suele generar controversia ya que no existen estudios concluyentes sobre su posible beneficio, aunque, según las circunstancias del paciente, pueden ser usados bajo vigilancia y seguimiento. También, las vitaminas, con función antioxidante, que se añaden como suplementos, muestran que suelen ser más beneficiosas en combinaciones de preparados multivitamínicos que adicionadas de manera independiente a la NP.

Desde el ámbito de la tecnología farmacéutica, la elaboración de la NP suplementada implica controlar una serie de factores tales como pH, reacciones de precipitación, oxidación, peroxidación, coalescencia y cremado, tamaño de partícula y las interacciones calcio-fosfato que pueden condicionar su estabilidad, y por tanto biodisponibilidad. De nutrientes y suplementos nutricionales.

El presente trabajo supone un punto de partida para una línea de investigación más exhaustiva y profunda que permita estudiar, sobre la práctica clínica diaria, los distintos tipos de suplementos más utilizados en la NP y sus beneficios en la antesala de la muerte.

Bibliografía

1. Cohen CB. Interdisciplinary consultation on the care of the critically ill and dying: the role of one hospital ethics committee. *Crit Care Med*. 1982; 10(11):776-84. doi: 10.1097/00003246-198211000-00018.
2. SECPAL. Problemas éticos al final de la vida. Disponible en: <https://www.secpal.com/PROBLEMAS-ETICOS-AL-FINAL-DE-LA-VIDA> consultada el 22/05/2021.
3. Patel JJ, Codner P. Controversies in Critical Care Nutrition Support. *Crit Care Clin*. 2016; 32(2):173-89. doi: 10.1016/j.ccc.2015.11.002.

4. Felbinger TW, Mayer K, Richter HP. Supplemental parenteral nutrition. Friend or foe? The EPaNIC study. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2011; 106(3):218-20. doi: 10.1007/s00063-011-0055-0.
5. Caccialanza R, Cereda E, Caraccia M, et al. Early 7-day supplemental parenteral nutrition improves body composition and muscle strength in hypophagic cancer patients at nutritional risk. *Support Care Cancer*. 2019; 27(7): 2497-2506. doi: 10.1007/s00520-018-4527-0.
6. Unger N, Holzgrabe U. Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 5; 147:125-139. doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.064.
7. Vega T, Arrieta E, Lozano JE, et al. Atención sanitaria paliativa y de soporte de los equipos de atención primaria en el domicilio. *Gac Sanit*. 2011; 25(3):205-10. doi: 10.1016/j.gaceta.2011.02.005.
8. Chappuy L, Charroin C, Vételé F, et al. Stability and sterility of parenteral nutrition admixture for patients home care manufactured by the automated compounding BAXA® EM 2400. *Ann Pharm Fr*. 2013; 71(6):401-9. doi: 10.1016/j.pharma.2013.08.011.
9. Hutton B, Catalá-López F, Moher D. La extensión de la declaración PRISMA para revisiones sistemáticas que incorporan metaanálisis en red: PRISMA-NMA. *Med Clin (Barc)* 2016; 147(6):231-80.
10. Cortez GJ. Aspectos bioéticos en el final de la vida: El Derecho a Morir con Dignidad. *Cuadernos Hospital de Clínicas*. 2006; 51 (2) 97-102.
11. Rivas García F. Alimentación en la enfermedad terminal: Una reflexión desde la biopolítica. *Revista Iberoamericana De Bioética*. 2021;(15): 01-09. <https://doi.org/10.14422/rib.i15.y2021.009>.
12. Salpeter SR, Luo EJ, Malter DS, Stuart B. Systematic review of noncancer presentations with a median survival of 6 months or less. *Am J Med*. 2012; 125(5):512.e1-6. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.07.028.
13. Adams ABC of palliative care. The last 48 hours. *Br Med J*. 1997; 315: 1600-1603.
14. Chan RJ, Webster J, Bowers A. End-of-life care pathways for improving outcomes in caring for the dying. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 2(2):CD008006. doi: 10.1002/14651858.CD008006.pub4.
15. Hoffer LJ, Bistran BR. Nutrition in critical illness: a current conundrum. *F1000Res*. 2016; 18;5:2531. doi: 10.12688/f1000research.9278.1.
16. Marian M. Carbohydrate metabolism. A comparison of stress and non stress states, en: Cresci G, editor. *Nutrition for the Critically Ill Patient. A Guide to Practice*. Second edition, Boca Raton, FL, CRC Press; 2015, pp. 25-70.
17. Godinjak A, Jusufovic S, Rama A, et al. Hyperlactatemia and the Importance of Repeated Lactate Measurements in Critically Ill Patients. *Med Arch*. 2017; 71(6):404-407. doi: 10.5455/medarh.2017.71.404-407.
18. Weijs PJ, Looijaard WG, Beishuizen A, Girbes AR, Oudemans-van Straaten HM. Early high protein intake is associated with low mortality and energy overfeeding with high mortality in non-septic mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care*. 2014; 18(6):70. doi: 10.1186/s13054-014-0701-z.
19. Singer P, Pichard C. Reconciling divergent results of the latest parenteral nutrition studies in the ICU. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16(2):187-93. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835c34be.
20. Bozzetti F. Parenteral nutrition. *Nutrition*. 2019; 66:101-107. doi: 10.1016/j.nut.2019.03.013.
21. Del Río MI, Shand B, Bonati P, et al. Hydration and nutrition at the end of life: a systematic review of emotional impact, perceptions, and decision-making among patients, family, and health care staff. *Psychooncology*. 2012; 21(9):913-21. doi: 10.1002/pon.2099.
22. Druyan ME, Compher C, Boullata JI, et al; American Society for Parenteral and Enteral Nutrition Board of Directors. Clinical Guidelines For the Use of Parenteral and Enteral Nutrition in Adult and Pediatric Patients: applying the GRADE system to development of A.S.P.E.N. clinical guidelines. *JPEN*. 2012; 36(1):77-80. doi: 10.1177/0148607111420157.
23. Roberts KM, Nahikian-Nelms M, Ukleja A, Lara LF. Nutritional Aspects of Acute Pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2018;47(1):77-94. doi: 10.1016/j.gtc.2017.10.002.

24. Berger MM. The 2013 Arvid Wretling lecture: evolving concepts in parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2014; 33(4): 563-70. doi: 10.1016/j.clnu.2014.03.005.
25. Windpessl M, Mayrbaeurl B, Baldinger C, et al. Refeeding Syndrome in Oncology: Report of Four Cases. *World J Oncol*. 2017;8(1):25-29. doi: 10.14740/wjon1007w. Epub 2017 Feb 23.
26. Cotogni P. Enteral versus parenteral nutrition in cancer patients: evidences and controversies. *Ann Palliat Med*. 2016; 5(1):42-9. doi: 10.3978/j.issn.2224-5820.2016.01.05.
27. Mitchell J, Jatoi A. Parenteral nutrition in patients with advanced cancer: merging perspectives from the patient and healthcare provider. *Semin Oncol*. 2011;38(3):439-42. doi: 10.1053/j.seminoncol.2011.03.020.
28. Gillespie L, Raftery AM. Nutrition in palliative and end-of-life care. *Br J Community Nurs* 2014; Suppl: S1520. doi:10.12968/bjcn.2014.19.Sup7.S15
29. Hui D, Dev R, Bruera E. The last days of life: symptom burden and impact on nutrition and hydration in cancer patients. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2015; 9(4): 346-54. doi: 10.1097/SPC.0000000000000171.
30. Gil et al. *Tratado de Nutrición Humana*. Tomo IV. Buenos Aires; Médica Panamericana; 2 ed; 2010. XXVI, pp.349-55.
31. ASPEN. *Parenteral Nutrition Handbook*, Third Edition. 2020.
32. Iacone R, Scanzano C, Santarpia L, Cioffi I, Contaldo F, Pasanisi F. Macronutrients in Parenteral Nutrition: Amino Acids. *Nutrients*. 2020;12(3):772. doi: 10.3390/nu12030772.
33. Mechanick JI, Carbone S, Dickerson RN, et al. ASPEN COVID-19 Task Force on Nutrition Research. Clinical Nutrition Research and the COVID-19 Pandemic: A Scoping Review of the ASPEN COVID-19 Task Force on Nutrition Research. *JPEN*. 2021;45(1):13-31. doi: 10.1002/jpen.2036.
34. Sadu Singh BK, Narayanan SS, Khor BH, et al. Composition and Functionality of Lipid Emulsions in Parenteral Nutrition: Examining Evidence in Clinical Applications. *Front Pharmacol*. 2020;11:506. doi: 10.3389/fphar.2020.00506.
35. Reber E, Messerli M, Stanga Z, Mühlebach S. Pharmaceutical Aspects of Artificial Nutrition. *J Clin Med*. 2019;19;8(11):2017. doi: 10.3390/jcm8112017.
36. McCulloch A, Bansiya V, Woodward JM. Addition of Insulin to Parenteral Nutrition for Control of Hyperglycemia. *JPEN*. 2018; 42(5):846-854. doi: 10.1177/0148607117722750.
37. Barco S, Atema JJ, Coppens M, Serlie MJ, Middeldorp S. Anticoagulants for the prevention and treatment of catheter-related thrombosis in adults and children on parenteral nutrition: a systematic review and critical appraisal. *Blood Transfus*. 2017;15(4):369-377. doi: 10.2450/2016.0031-16.
38. SENPE. Documento de consenso español sobre preparación de nutrientes parenterales. 2008. <https://senpe.com/documentacion/grupos/ConsensoPreparacion2008.pdf>
39. Wischmeyer PE. Glutamine: mode of action in critical illness. *Crit Care Med*. 2007; 35(9 Suppl): S541-4. doi: 10.1097/01.CCM.0000278064.32780.D3.
40. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med*. 2002; 30:2022-9. doi: 10.1097/00003246-200209000-00011.
41. Smedberg M, Wernerman J. Is the glutamine story over? *Crit Care*. 2016; 20(1):361. doi: 10.1186/s13054-016-1531-y.
42. McCarthy MS, Martindale RG. Immunonutrition in Critical Illness: What Is the Role? *Nutr Clin Pract*. 2018; 33(3):348-358. doi: 10.1002/ncp.10102.
43. Grau T, Bonet A, Miñambres E, et al. The effect of L-alanyl-L-glutamine dipeptide supplemented total parenteral nutrition on infectious morbidity and insulin sensitivity in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2011 Jun;39(6):1263-8. doi: 10.1097/CCM.0b013e31820eb774.

- 44.** Goeters C, Wenn A, Mertes N, et al. L-Alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2002; 30:2032-7. doi: 10.1097/00003246-200209000-00013.
- 45.** De Waele E, Malbrain MLNG, Spapen H. Nutrition in Sepsis: A Bench-to-Bedside Review. *Nutrients.* 2020;2;12(2):395. doi: 10.3390/nu12020395..
- 46.** Kalil AC, Sevransky JE, Myers DE, Esposito C, Vandivier RW, Eichacker P. Preclinical trial of L-arginine monotherapy alone or with N-acetylcysteine in septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(11):2719-28. doi: 10.1097/01.CCM.0000242757.26245.03.
- 47.** Rosenthal MD, Carrott PW, Patel J, Kiraly L, Martindale RG. Parenteral or Enteral Arginine Supplementation Safety and Efficacy. *J Nutr.* 2016; 146(12):2594S-2600S. doi: 10.3945/jn.115.228544.
- 48.** Koga Y, Povalko N, Inoue E, et al. Therapeutic regimen of L-arginine for MELAS: 9-year, prospective, multicenter, clinical research. *J Neurol.* 2018; 265(12):2861-2874. doi: 10.1007/s00415-018-9057-7.
- 49.** Ginguay A, De Bandt JP, Cynober L. Indications and contraindications for infusing specific amino acids (leucine, glutamine, arginine, citrulline, and taurine) in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016, 19(2):161-9. doi: 10.1097/MCO.0000000000000255.
- 50.** Mayers T, Kashiwagi S, Mathis BJ, et al. International review of national-level guidelines on end-of-life care with focus on the withholding and withdrawing of artificial nutrition and hydration. *Geriatr Gerontol Int.* 2019; 19(9):847-853. doi: 10.1111/ggi.13741.
- 51.** Da Silva JS, Seres DS, Sabino K, et al. Parenteral Nutrition Safety and Clinical Practice Committees, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. ASPEN consensus recommendations for refeeding syndrome. *Nutrition in Clinical Practice*, 2020;35(2), 178-195. doi: 10.1002/ncp.10474.
- 52.** Walmsley RS. Refeeding syndrome: screening, incidence, and treatment during parenteral nutrition. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013; 28 Suppl 4:113-7. doi: 10.1111/jgh.12345.
- 53.** Mehta NM, Skillman HE, Irving SY, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Pediatric Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. *Pediatr Crit Care Med.* 2017 Jul;18(7):675-715. doi: 10.1097/PCC.0000000000001134.
- 54.** Jin J, Mulesa L, Carrilero Rouillet M. Trace Elements in Parenteral Nutrition: Considerations for the Prescribing Clinician. *Nutrients.* 2017 28;9(5):440. doi: 10.3390/nu9050440
- 55.** Palm E, Dotson B. Copper and Zinc Deficiency in a Patient Receiving Long-Term Parenteral Nutrition During a Shortage of Parenteral Trace Element Products. *J PEN.* 2015;39(8):986-9. doi: 10.1177/0148607114549255.
- 56.** Gudivada KK, Kumar A, Shariff M, et al. Antioxidant micronutrient supplementation in critically ill adults: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Clin Nutr*, 2020; 40(3): 740-750. doi: 10.1016/j.clnu.2020.06.033.
- 57.** Hargreaves IP, Mantle D. Supplementation with selenium and coenzyme Q10 in critically ill patients. *Br J Hosp Med (Lond).* 2019; 80(10):589-593. doi: 10.12968/hmed.2019.80.10.589.
- 58.** Slattery E, Rumore MM, Douglas JS, Seres DS. 3-in-1 vs 2-in-1 parenteral nutrition in adults: a review. *Nutr Clin Pract.* 2014; 29(5):631-5. doi: 10.1177/0884533614533611.
- 59.** Miloudi K, Comte B, Rouleau T, Montoudis A, Levy E, Lavoie JC. The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes. *Clin Nutr.* 2012; 31(4):526-34. doi: 10.1016/j.clnu.2011.12.012.
- 60.** Allen LV Jr. Sterile Basics: Intravenous Admixture Preparation Considerations, Part 5: pH Considerations. *Int J Pharm Compd.* 2020;24(4):305-309.
- 61.** García de Lorenzo A, Álvarez J, Bermejo T, Gomis P, Piñeiro G. Micronutrientes en nutrición parenteral. *Nutr Hosp.* 2009; 24(2): 152-155.

- 62.** Akatsu H, Manabe T, Kawade Y, et al. Iron deposition in autopsied liver specimens from older patients receiving intravenous iron infusion. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237104. doi: 10.1371/journal.pone.0237104.
- 63.** Driscoll DF. Pharmaceutical and Clinical Aspects of Lipid Injectable Emulsions. *JPEN*. 2017;41(1):125-134. doi: 10.1177/0148607116673187.
- 64.** Hardy G, Puzovic M. Formulation, stability, and administration of parenteral nutrition with new lipid emulsions. *Nutr Clin Pract*. 2009;24(5):616-25. doi: 10.1177/0884533609342445.
- 65.** Watrobska-Swietlikowska D, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Łuszkiewicz K. Evaluation of physical stability of all in one parenteral admixtures for pediatric home care with high electrolytes concentrations. *Nutr Hosp*. 2014; 31(1):236-43. doi: 10.3305/nh.2015.31.1.7965.
- 66.** Grau T, Bonet A, Miñambres E, et al. The effect of L-alanyl-L-glutamine dipeptide supplemented total parenteral nutrition on infectious morbidity and insulin sensitivity in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2011;39(6):1263-8. doi: 10.1097/CCM.0b013e31820eb774.
- 67.** Vila J. *Tecnología Farmacéutica. Vol II: Formas farmacéuticas*. Editorial Síntesis. Madrid, 1997, pp. 320-352.
- 68.** Mitrus O, Żuraw M, Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C, Paiva-Martins F. Targeting Antioxidants to Interfaces: Control of the Oxidative Stability of Lipid-Based Emulsions. *J Agric Food Chem*. 2019; 20; 67(11):3266-3274. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06545.
- 69.** Athanasiou C, Hatziantoniou S, Skouroliakou M, Markantonis-Kyroudis S. Assessment of the physicochemical stability of all-in-one parenteral emulsions for neonates according to USP specifications. *JPEN*. 2014; 38(7):867-72. doi: 10.1177/0148607113499589.
- 70.** Sforzini A, Bersani G, Stancari A, Grossi G, Bonoli A, Ceschel GC. Analysis of all-in-one parenteral nutrition admixtures by liquid chromatography and laser diffraction: study of stability. *J Pharm Biomed Anal*. 2001; 24(5-6):1099-109. doi: 10.1016/s0731-7085(00)00564-1.
- 71.** Biesalski HK, Bischoff SC, Boehles HJ, Muehlhoefer A; Working group for developing the guidelines for parenteral nutrition of The German Association for Nutritional Medicine. Water, electrolytes, vitamins and trace elements - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 7. *Ger Med Sci*. 2009;7:Doc21. doi: 10.3205/000080.
- 72.** Martí-Bonmatí E, Felíu AP, Tellería AV. Vitamin and oligoelement additives in parenteral nutrition. *Farm Hosp*. 2011; 35(2):96-7. doi: 10.1016/j.farma.2010.05.007.
- 73.** Stawny M, Olijarczyk R, Jaroszkiewicz E, Jelińska A. Pharmaceutical point of view on parenteral nutrition. *Scientific World Journal*. 2013; 2013:415310. doi: 10.1155/2013/415310.

doi: 10.30827/ars.v63i4.26059

Artículos de revisión

Liposomas en el desarrollo de formas farmacéuticas semisólidas

Liposomes in pharmaceutical semisolid dosage forms

Nathalie Vega-Sánchez¹  0000-0003-1793-7716

María Fernanda Montero-Jara¹  0000-0002-9042-6085

Rebeca Marín-Fajardo¹  0000-0003-4685-3706

Marianela Chavarría-Rojas¹  0000-0002-0507-6982

¹Universidad Latina de Costa Rica, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Farmacia, San José, Costa Rica.

Correspondencia

Marianela Chavarría-Rojas
marianela.chavarriar@ulatina.cr

Recibido: 02.09.2022

Aceptado: 14.09.2022

Publicado: 28.09.2022

Financiación

Este trabajo no se realizó con ningún tipo de financiamiento.

Conflicto de intereses

Los autores dejan constancia que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con la investigación realizada en el presente artículo.

Resumen

Introducción: los liposomas son nanovesículas esféricas compuestas por fosfolípidos, característica directamente relacionada con su permeabilidad. Son estructuras ampliamente utilizadas como sistemas de entrega de fármacos cuando se administran por vía dérmica y transdérmica.

Método: se realizó una revisión bibliográfica considerando artículos científicos y patentes publicados en las siguientes bases de datos: Google Académico, Google Patents, Pubmed, Elsevier, ScienceDirect, Scielo. Se incluyeron artículos en idioma inglés y español publicados de 2012 a 2022, seleccionando los más relevantes en cuanto al tema.

Resultados: en total, se seleccionaron 31 artículos y 9 patentes relacionados con el uso de liposomas en formulaciones semisólidas con fármacos de diversas categorías farmacológicas, como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticosteroides, analgésicos opioides, anestésicos locales, antibióticos, antimicóticos, antivirales, antimetabolitos, vitaminas y fitoquímicos.

Conclusiones: los avances nanotecnológicos tienen una aplicación creciente en la formulación de medicamentos. El uso de sistemas liposomales corresponde a una herramienta de amplia utilidad y altamente beneficiosa para la formulación de semisólidos.

Palabras clave: liposomas; piel; semisólidos; nanotecnología; dermis; penetración dérmica.

Abstract

Introduction: liposomes are spherical phospholipid nanovesicles, an essential characteristic for their permeability. Hence, they are widely used as drug delivery systems for dermal and transdermal administration.

Method: a bibliographic review of scientific articles and patents published on different information sources was carried out. We reviewed Google Scholar, Google Patents, Pubmed, Elsevier, ScienceDirect, Scielo, and specialized journals, both in English and Spanish. The articles were published between 2012 and 2022, and the most relevant were selected.

Results: in total, 31 articles and 9 patents were selected, to be evaluated and analyzed. These articles demonstrate the use of liposomes in semisolid dosage forms of various pharmacological categories, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), corticosteroids, opioid analgesics, local anesthetics, antibiotics, antifungals, antivirals, antimetabolites, vitamins, phytochemicals, and some cases of skin pathologies treatment.

Conclusions: nanotechnology and its advances are especially interesting for drug formulation. The use of liposomal systems has become a useful tool, which is beneficial, due to its characteristics, for the formulation of semi-solid dosage forms.

Keywords: liposomes; skin; semisolid dosage forms; nanotechnology; dermis; dermal penetration.

Puntos clave

La nanotecnología es una herramienta ampliamente utilizada en la medicina que ha permitido el desarrollo de diferentes estrategias para la formulación de sistemas farmacéuticos. Los liposomas son un tipo de nanovesículas caracterizadas por tener una membrana de composición lipídica similar a las membranas celulares, lo que se ha relacionado con un incremento en la permeabilidad, la biodisponibilidad, y por tanto, en el efecto terapéutico de diferentes principios activos.

El uso de liposomas en sistemas farmacéuticos ha demostrado mejorar el perfil de seguridad, eficacia y calidad de diferentes productos, lo que se traduce en nuevas alternativas de tratamiento.

Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y conforma la principal barrera de protección inmunológica ante agentes externos, siendo esta una de sus principales funciones. Existen tres diferentes capas que conforman la piel, estas son la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es la capa más externa y contiene al estrato córneo, una capa fina de células metabólicamente inactivas que corresponde a la principal barrera física que deben atravesar los agentes externos para penetrar la piel. La dermis está conformada por tejido vascular y conectivo. Y en la zona más interna de la piel se encuentra la hipodermis, una capa formada por tejido adiposo que brinda soporte a la dermis y a la epidermis^(1,2).

El estrato córneo está formado por células no viables, anucleadas y queratinizadas, denominadas corneocitos, los cuales forman la capa de barrera, que permite la retención de agua dentro del cuerpo, brinda protección y limita el ingreso de agentes externos⁽²⁾. La mayoría de las moléculas terapéuticas carecen de las características necesarias para atravesar la barrera cutánea de manera efectiva, sin embargo, a pesar de este hecho, muchas moléculas terapéuticas se formulan de manera que sea posible administrarlas mediante el uso de esta vía, estudiando diferentes agentes que potencien la penetración dérmica o transdérmica de fármacos de forma eficiente^(2,3).

El uso de la nanotecnología, mediante el uso de nanovesículas, forma parte de los avances tecnológicos más estudiados y utilizados para la formulación de medicamentos^(2,4). Los liposomas están ubicados dentro de esta categoría y su uso se relaciona con diferentes ventajas, tales como la protección de las moléculas activas, el control de la liberación, la optimización de propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas, como por ejemplo la solubilidad y biodisponibilidad, y además, el direccionamiento hacia una diana terapéutica específica^(5,6).

Los liposomas se pueden definir como vesículas en forma de esfera, compuestos por fosfolípidos anfifílicos y colesterol. Los fosfolípidos anfifílicos forman una bicapa cerrada que encapsula los componentes del medio acuoso y está en contacto con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos de membrana⁽³⁻⁵⁾. El uso de esta tecnología en el desarrollo de medicamentos también encuentra gran utilidad en fármacos altamente hidrofóbicos que podrían encapsularse para potenciar su actividad farmacológica y sacar provecho de las características propias del sistema liposomal^(3,6).

Por otra parte, el uso de sistemas liposomales ha evidenciado buena efectividad para la entrega de fármacos, principalmente mediante el contacto facilitado que mejora la interacción con la membrana de la célula blanco, lo que permite un intercambio lípido-lípido con la monocapa lipídica del liposoma, de manera que se acelera el flujo de fármacos lipofílicos^(5,6).

Los liposomas se pueden clasificar según diferentes variables, como por ejemplo su composición, vía de administración o método de preparación y obtención⁽⁴⁻⁶⁾. Los liposomas se han convertido en un tipo de tecnología ampliamente estudiada para la formulación de fármacos debido a su gran utilidad y eficacia demostrada⁽⁶⁾. En el desarrollo de fármacos dérmicos o transdérmicos, los liposomas han evidenciado ser una excelente opción de formulación debido a su composición lipídica tan similar a la composición de la piel. Hay gran cantidad de formulaciones liposomales de distintas generaciones que han sido estudiadas y evaluadas para ser administradas a través de la piel, lo cual amplía las opciones

de formulación de sistemas farmacéuticos⁽⁹⁾. Es por esto que el siguiente trabajo tiene como propósito evidenciar las aplicaciones de los liposomas en la formulación de sistemas farmacéuticos semisólidos de aplicación dérmica y transdérmica.

Métodos

Se realizó una revisión bibliográfica donde se consultaron las bases de datos Google Académico, Pub-Med, Elsevier, ScienceDirect, SCIELO y Google Patents. Las palabras clave utilizadas fueron liposomas, piel, celdas de difusión de Franz, semisólidos, transdérmico, dérmico. Se consideraron los artículos y patentes en inglés y español publicados en el periodo 2012-2022. Se consideraron como elegibles los artículos que, además de los criterios anteriores, cumplieran con evidenciar de forma contundente la aplicabilidad de los sistemas liposomales en el desarrollo de formulaciones semisólidas de aplicación tópica con acción localizada o sistémica de diferentes grupos o categorías farmacológicas.

En total, se utilizaron 31 artículos científicos y 9 patentes, estos documentos fueron distribuidos de manera que clasificaron la aplicabilidad de los sistemas liposomales en las diferentes categorías farmacológicas consideradas, siendo estas: antiinflamatorios no esteroideos (6 artículos y 1 patente), analgésicos opioides (2 artículos), corticosteroides (2 artículos), anestésicos locales (2 artículos y 1 patente), antibióticos (3 artículos y 1 patente), antimicóticos (4 artículos y 1 patente), antivirales (1 artículo), antimetabolitos (2 artículos), vitaminas (3 artículos), fitofármacos (2 artículos) y casos adicionales en cuanto a tratamiento de enfermedades dérmicas (4 artículos y 5 patentes).

Resultados

En total, se consideraron 31 artículos científicos y 9 patentes, tal como se muestra en la Tabla 1 y Tabla 2, donde se presenta una visión general del estudio analizado.

Tabla 1. Artículos científicos que evidencian el uso de sistemas liposomales en el desarrollo de formulaciones semisólidas.

Categoría farmacológica	Descripción	Autor/año
Antiinflamatorios no esteroideos.	Formulación que busca mejorar la permeación transdérmica de diclofenaco sódico en gel mediante el uso de liposomas.	Ghanbarzadeh et al. (2013) ⁽¹⁰⁾
Antiinflamatorios no esteroideos.	Ensayo clínico controlado de la eficacia de un gel liposomal de diclofenaco en pacientes con osteoartritis.	Bhatia et al. (2020) ⁽¹¹⁾
Antiinflamatorios no esteroideos.	Comparación <i>ex vivo</i> del transporte transdérmico de un gel de diclofenaco liposomal vs gel en emulsión sencilla.	Sacha et al. (2019) ⁽¹³⁾
Antiinflamatorios no esteroideos.	Evaluación de la penetración en piel de una formulación liposomal de celecoxib.	Moghimpour et al. (2015) ⁽¹⁴⁾
Antiinflamatorios no esteroideos.	Fabricación de nanovesículas de aceclofenaco para la formulación transdérmica.	Gaur et al. (2013) ⁽¹⁵⁾
Antiinflamatorios no esteroideos.	Estudio <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> de la encapsulación de aceclofenaco en liposomas.	Sharma et al. (2017) ⁽¹⁶⁾
Analgésicos Opioides	Desarrollo de una formulación tópica eficaz que contenga loperamida utilizando la administración liposomal.	Iwaskiewicz et al. (2014) ⁽¹⁸⁾
Analgésicos Opioides	Determinación del método de equilibrio de diálisis más apropiado para evaluar las formulaciones de gel liposomal que contienen fármacos hidrofóbicos.	Hua et al. (2014) ⁽¹⁹⁾
Corticosteroides	Preparación de un gel proliposomal que contiene un agente antiinflamatorio esteroideo, prednisolona, destinado a la aplicación tópica.	Kurakula et al. (2012) ⁽²⁰⁾

Categoría farmacológica	Descripción	Autor/año
Corticoesteroides	Evaluación del beneficio de un gel liposomal de ácido hialurónico para la administración sostenida de un corticoide.	Kechai et al. (2016) ⁽²¹⁾
Anestésicos locales	Caracterización de las formulaciones liposomales de lidocaína para uso tópico en la mucosa oral.	Franz et al. (2014) ⁽²²⁾
Anestésicos locales	Comparación de dos tipos de nanotransportadores: liposomas y nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros para la administración de lidocaína.	Wang et al. (2016) ⁽²³⁾
Antibióticos	Estudio de liposomas con cloranfenicol para mejorar la focalización en el folículo piloso.	Hsu et al. (2017) ⁽²⁵⁾
Antibióticos	Estudio clínico de un hidrogel híbrido para administrar bacteriocina en heridas infectadas.	Thapa et al. (2021) ⁽²⁶⁾
Antibióticos	Formulación de un hidrogel que contiene liposomas para administrar tópicamente antibióticos.	Gao et al. (2014) ⁽²⁷⁾
Antimicóticos	Revisión bibliográfica sobre estudios liposomales de fármacos antimicóticos de aplicación dérmica.	Asadi et al. (2021) ⁽²⁹⁾
Antimicóticos	Revisión bibliográfica sobre la utilidad de las nanovesículas en infecciones fúngicas de la piel.	Verma et al. (2019) ⁽³⁰⁾
Antimicóticos	Formulación de liposomas de propilenglicol para administrar nitrato de miconazol tópico.	Elmoslemany et al. (2012) ⁽³¹⁾
Antimicóticos	Estudio preclínico de pantomicina encapsulada en liposomas para vulvovaginitis.	İzgülü et al. (2017) ⁽³²⁾
Antivirales	Desarrollo de liposomas con polietilenglicol que contienen interferón-alfa para una terapia localizada del Virus Papiloma Humano.	Jørholmen et al. (2017) ⁽³⁴⁾
Antimetabolitos	Desarrollo de liposomas con 5-fluorouracilo para mejorar la penetración del fármaco en el estrato córneo.	Hussain et al. (2014) ⁽³⁵⁾
Antimetabolitos	Investigar los liposomas ultra deformables atrapados en metotrexato (MTX-UDL) para una posible aplicación transdérmica	Zeb et al. (2016) ⁽³⁶⁾
Vitaminas	Revisión sistemática de artículos sobre los usos clínicos y nuevos sistemas o configuraciones de la vitamina C para su llegada bioactiva a los confines de la piel.	Brignone et al. (2020) ⁽³⁸⁾
Vitaminas	Investigación sobre las características del liposoma-hidrogel RA.	Xia et al. (2015) ⁽³⁹⁾
Vitaminas	Evaluación de la biodisponibilidad tópica de liposomas de ascorbato, así como sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.	Serrano et al. (2015) ⁽⁴⁰⁾
Fitoquímicos	Formulación de crema en frío para evaluar el efecto sinérgico con liposomas para tratar heridas.	Arguedas et al. (2021) ⁽⁴²⁾
Fitoquímicos	Estudio <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> de un gel nanoestructurado de quercetina y resveratrol.	Imran et al. (2020) ⁽⁴³⁾
Aplicaciones adicionales	Desarrollo de una formulación nanoliposomal de anfotericina B tópica.	Jaafari et al. (2019) ⁽⁴⁴⁾
Aplicaciones adicionales	Estudio <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> de un gel de anfotericina B para tratamiento tópico.	Berenguer et al. (2020) ⁽⁴⁵⁾
Aplicaciones adicionales	Formulación de un gel liposomal con ácido retinoico y betametasona para la psoriasis.	Wang et al. (2020) ⁽⁴⁶⁾
Aplicaciones adicionales	Evaluación de la actividad despigmentante y la penetración en la piel de formulaciones de liposomas que encapsulan clorhidrato de cisteamina.	Atallah et al. (2022) ⁽⁴⁷⁾

Tabla 2. Patentes que evidencian el uso de sistemas liposomales en el desarrollo de fármacos semisólidos.

Categoría farmacológica	Nombre	Número de patente	Autor/Año
Antiinflamatorios no esteroideos	Formulaciones de AINES, basadas en agregados altamente adaptables, para mejorar el transporte a través de barreras y la administración tópica de fármacos	US 7473432B2	Cevic G et al. (2009) ⁽¹²⁾
Anestésicos locales	Formulaciones nanoliposomales y método de uso.	WO 2014/144365 A1	Hood R et al. (2014) ⁽²⁴⁾
Antibióticos	Composición de doxiciclina en liposomas para la prevención, mejora y/o tratamiento de patologías oculares.	WO 2016/046442 A1	Villegas (2016) ⁽²⁸⁾
Antimicóticos	Composición sinérgica que comprende propóleo y ácido carnósico para uso en la prevención y el tratamiento de candidiasis	WO 2016/124957 A1	Lozano et al. (2016) ⁽³³⁾
Aplicaciones adicionales	Nanoliposomas funcionalizados con péptidos	WO 2012/101309 A1	Pozo et al. (2012) ⁽⁴⁸⁾
Aplicaciones adicionales	Formulación en gel de liposomas, su preparación y uso para suprimir la proliferación de cicatrices.	CN 107137345A	XXXXXXXXXX (2017) ⁽⁴⁹⁾
Aplicaciones adicionales	Formulación de un gel de la sal sódica de heparina para administración dérmica y su método de preparación.	WO 2015/181746 A1	Bilmin et al. (2015) ⁽⁵⁰⁾
Aplicaciones adicionales	Hidrogel	US 9415133 B2	Scherer et al. (2016) ⁽⁵¹⁾
Aplicaciones adicionales	Composición de azufre liposomado	WO 2015/114194 A1	González (2015) ⁽⁵²⁾

Todos estos recursos consultados describen y ejemplifican ampliamente el uso de liposomas en formulaciones semisólidas de administración dérmica o transdérmica. A continuación, se explican los hallazgos obtenidos.

Antiinflamatorios no Esteroides (AINEs)

Los antiinflamatorios no esteroideos forman parte de los fármacos mayormente prescritos, en una diversa cantidad de patologías o de síntomas. Gracias a los sistemas liposomales y a la encapsulación del fármaco, se ha logrado mejorar su solubilidad, potenciar su permeación, y mejorar los efectos terapéuticos del medicamento^(10,11). Por medio de las Celdas de Franz se analizó la penetración en la piel y el depósito de gel de diclofenaco, comprobando que los sistemas vesiculares benefician la cantidad de fármaco permeado a través de la piel, ya que los geles formulados con sistemas vesiculares, como liposomas, mejoraron la administración del diclofenaco, un fármaco hidrofóbico, a través de la piel⁽¹⁰⁾.

Por otra parte, los pacientes que son tratados con un gel liposomal de diclofenaco presentaron mejoras atribuidas a este tratamiento en comparación con otras formulaciones sin liposomas y contra placebo, además, no hubo informes de eventos adversos. De esta manera, se evidencia que el uso de sistemas liposomales para la administración de este fármaco presenta una ventaja clínica considerable. En evaluaciones *in vivo* y *ex vivo* se determinó la superioridad en cuanto a la calidad y la eficacia en la formulación en la que se encuentran incorporados sistemas liposomales⁽¹¹⁻¹³⁾. En piel humana, se logró demostrar que la absorción transdérmica del gel de diclofenaco fue superior a los demás, esto debido a que la composición del sistema liposomal presenta beneficios, desde el momento de administración y de liberación de la molécula, hasta la solubilidad, permeabilidad y concentración de la misma, generando que una mayor cantidad de fármaco alcance la diana terapéutica⁽¹³⁾.

El celecoxib es un principio activo que posee propiedades de flujo y compresibilidad desfavorables y es altamente hidrofóbico, por esta razón se utilizó la tecnología liposomal para generar una formulación de celecoxib de administración dérmica o transdérmica. A raíz de esto se determinó que el colesterol y

la lecitina incluidas en el sistema liposomal, poseen un papel fundamental en la administración y en la permeabilidad de la formulación a través de la piel⁽¹⁴⁾.

En el caso del aceclofenaco, los sistemas liposomales, benefician su solubilidad y concentración, lo que se relaciona con propiedades fisicoquímicas y dermato-cinéticas óptimas para ser administrado por esta vía. Esto permitió el desarrollo de una formulación estable y efectiva^(15,16).

Analgésicos opioides

El dolor es uno de los síntomas que mayormente se presentan en los sistemas de salud y que preocupa y alerta en forma permanente a los investigadores. Los opioides son la clase de analgésicos más importante para el manejo del dolor moderado a severo debido a su efectividad, dosificación fácil y relación riesgo/beneficio favorable⁽¹⁷⁾.

La loperamida encapsulada dentro de sistemas liposomales de aplicación tópica ha mejorado la eficacia terapéutica sobre las formulaciones convencionales para el tratamiento local del dolor, proporcionando efectos analgésicos y antiinflamatorios similares a los opioides endógenos periféricos. Esta preparación tiene el potencial de evitar los efectos adversos vistos con AINEs y también optimizar la retención de la droga en el sitio donde se requiere la acción. Un estudio demuestra que la aplicación de loperamida a sitios dérmicos donde la integridad de la piel no se ha visto afectada, no tiene actividad analgésica significativa, esto debido a que la loperamida tiene una alta afinidad por las membranas lipídicas y también tiene la capacidad de reducir la tensión superficial, por lo tanto, permanece en las membranas y no difunde a través de ellas. La ventaja de esto es que disminuye altamente la capacidad de loperamida para causar reacciones adversas mediadas por opioides centrales y producir efectos secundarios. La desventaja, es que su uso tópico se limita a condiciones dolorosas asociadas con heridas abiertas como quemaduras o úlceras⁽¹⁸⁾.

Un estudio por el método de liberación de diálisis resultó útil para estudiar la liberación in vitro de sistemas de administración de micro y nanopartículas. En este método, los vehículos son cargados con el fármaco, el cual se separa físicamente del medio mediante una membrana de diálisis y la liberación se evalúa desde el exterior a lo largo del tiempo. Esta técnica se ha utilizado para estudiar una variedad de formulaciones, incluidos liposomas y nanopartículas; en este caso se estudió un gel liposomal encapsulado con loperamida. Se prepararon liposomas convencionales según el método de hidratación de película lipídica seca que fueron analizados mediante cuatro métodos y los resultados obtenidos demostraron que el método 1 (ensayo de liberación de fármacos en liposomas modificados que tiene en cuenta los parámetros de solubilidad) y el método 3 (ensayo de liberación de fármaco a partir de gel que contiene solución de fármaco libre) mostraron una liberación completa de la loperamida en el momento oportuno. En el método 1 se dio una liberación rápida de loperamida de poco más del 60 % en las primeras 3 horas y luego una liberación más lenta y sostenida hasta poco más del 70 % a las 24 horas. Mientras que en el método 3, los liposomas mostraron una liberación rápida del 98 % a las 2 horas⁽¹⁹⁾.

Corticosteroides

La prednisolona es un corticosteroide estudiado para su uso tópico como gel liposomal. En un estudio se prepararon varias formulaciones de proliposomas formulados como un gel de carbopol 2%. El gel proliposomal de prednisolona fue comparado con un hidrogel que contenía el mismo principio activo y se estudiaron sus propiedades de liberación y su farmacodinamia. Los resultados obtenidos demuestran que no existe una interacción entre el fármaco y el excipiente, el gel proliposomal presentó una liberación más prolongada de prednisolona que el hidrogel. La actividad antiinflamatoria del gel proliposomal mostró un porcentaje máximo de inhibición del edema del 60% en comparación con el hidrogel, el cual obtuvo un valor de 55%. Los estudios de estabilidad indicaron que el producto es estable y debe almacenarse a bajas temperaturas, tiene una liberación sostenida con actividad antiinflamatoria mejorada que brinda un potencial eficaz para la farmacoterapia tópica⁽²⁰⁾.

En otro estudio se preparó y administró un gel liposomal de ácido hialurónico que permite la liberación sostenida de un corticoide en el oído interno. Los resultados del estudio indican que el gel liposomal

es fácilmente inyectable, tiene un tiempo de residencia prolongado en el lugar de la inyección y ningún efecto negativo sobre los umbrales de audición fue observado en el modelo animal utilizado. Además, la formulación permite la liberación sostenida del fármaco en la perilinfa durante 30 días y promueve la conversión del profármaco cargado dentro de los liposomas (fosfato de dexametasona) en su forma activa (dexametasona) consiguiendo dosis terapéuticas en la perilinfa. De esta manera, se comprobó que la administración de gel liposomal de ácido hialurónico en el oído medio es una estrategia eficaz para la liberación sostenida de corticoides en el oído interno⁽²¹⁾.

Anestésicos locales

La encapsulación de fármacos en formulaciones liposomales representa un método alternativo para la administración de anestésicos locales ya que aumenta la duración de la analgesia y disminuye la toxicidad nerviosa central y cardíaca. Se caracterizó una formulación de lidocaína liposomal de uso tópico en la mucosa oral, los resultados del estudio demuestran que la encapsulación de lidocaína liposomal es capaz de mejorar la eficacia anestésica tópica en la disminución del dolor durante la inyección anestésica en la mucosa palatina. Además, se destaca que el gel liposomal de lidocaína al 5% se puede considerar como un anestésico tópico eficaz en odontología⁽²²⁾.

Los liposomas se usan comúnmente en anestesia local, no obstante, la estabilidad insuficiente de estos podría provocar una fuga rápida de los fármacos incorporados, por lo que se desarrolló un vehículo para la administración de terapias de nueva generación llamado “nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros” que tienen características tanto de las nanopartículas poliméricas como de los liposomas. Los estudios *in vitro* e *in vivo* ilustraron que las nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros tienen la posibilidad de funcionar como un sistema prometedor de administración de fármacos para superar la función de barrera de la piel y facilitar la administración de anestésicos a través de la piel con comportamiento de liberación sostenida⁽²³⁾.

Se puede destacar el caso de la dexmedetomidina, que al encapsularla en liposomas y formularla en un gel, se evita el uso de agujas. El uso de la tecnología de liposomas permite una liberación lenta del principio activo, mejorando la duración del efecto y evitando concentraciones plasmáticas elevadas que podrían ser riesgosas para el paciente. A esta formulación se le podría añadir anestésicos, glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos e incluso hormonas, mejorando la formulación según se requiera⁽²⁴⁾.

Antibióticos

En la actualidad, las infecciones bacterianas se están convirtiendo en un grave problema de salud pública, principalmente dirigido a la actual problemática que representa la resistencia antibiótica⁽²⁵⁾. Los antibióticos de acción tópica favorecen en el tratamiento de heridas abiertas que pueden ser infectadas por acción microbiana⁽²⁶⁾.

En la piel, la invasión de *S. aureus* en los folículos pilosos puede originar foliculitis, forúnculos o hidradenitis supurativa y ante estos padecimientos las nanopartículas proporcionan un medio de transferencia del fármaco a los apéndices cutáneos. Una formulación liposomal de cloranfenicol fue analizada mediante un estudio de celdas de difusión de Franz, pruebas de posible irritación (citotoxicidad cutánea) y de actividad. En el estudio se determinó que los liposomas maleables facilitan la permeación cutánea del fármaco ya que penetran fácilmente las bicapas lipídicas de la piel y esto mejora la absorción del principio activo. Ciertamente, la composición de la formulación liposomal va a tener un impacto directo en el mecanismo de acción y de penetración del principio activo, aunque en general, se puede afirmar que los liposomas representan utilidad en este tipo de tratamientos⁽²⁵⁾.

Otra aplicación destacable es la formulación de hidrogeles con antibióticos para el tratamiento de heridas infectadas⁽²⁶⁾. En un estudio se evaluó una formulación en hidrogel liposomal para la administración tópica de antimicrobianos y se determinó que la cinética de liberación alcanzada es eficaz para el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. Además, se observó como los liposomas se fusionan con la membrana bacteriana lo que evidencia que se trata de una tecnología robusta para administrar antibióticos tópicos⁽²⁷⁾.

A nivel oftálmico, la doxiciclina se puede encontrar en una formulación para el tratamiento de patologías oculares y gracias al uso de liposomas se puede mejorar la estabilidad de este antibiótico. Se ha comprobado la eficacia de la doxiciclina liposomal en diversas formas farmacéuticas semisólidas, tales como pomadas, pastas, cremas, emulsiones o geles, dando lugar a una amplia gama de investigaciones y nuevas formulaciones⁽²⁸⁾.

Antimicóticos

Las infecciones micóticas conforman uno de los problemas de salud más comunes a nivel mundial, por tanto, existen diferentes formulaciones tópicas que pueden contrarrestar y tratar esta condición. El uso de nanoliposomas aumenta la penetración a través del estrato córneo, lo que beneficia el efecto tópico y supera los diversos obstáculos propios de la piel. Los antimicóticos como el econazol, fluconazol, ketoconazol, clorhidrato de terbinafina, tolnaftato y miconazol encapsulados en sistemas liposomales han evidenciado una mejor penetración dérmica y mayores efectos localizados⁽²⁹⁾.

Una ventaja que presentan los liposomas en el caso de agentes antimicóticos es la alta carga de fármacos que permite la reducción de la toxicidad, mejor la biodisponibilidad, la biocompatibilidad y la estabilidad. Cuando el efecto es local, permite la disminución de los efectos adversos y penetra efectivamente el estrato córneo, que es un sitio específico de invasión por hongos. Además, resultan efectivos a nivel sistémico debido a su penetración transdérmica eficaz⁽³⁰⁾. Actualmente, existe evidencia del uso de liposomas de polietilenglicol para administrar miconazol tópico. Se ha evidenciado una mejora en la penetración y la retención en la piel, lo que se relaciona con efectividad del tratamiento⁽³¹⁾.

A nivel genital es común encontrar este tipo de infecciones, los sistemas liposomales han permitido el desarrollo de un polvo liofilizado liposomal de panomicocina para tratar la candidiasis vulvovaginal. Estos liposomas contienen lípidos que se encuentran en la composición del estrato córneo vaginal, lo que genera mayor liberación y absorción. Esta creación representa una gran ventaja debido a que los tratamientos antimicóticos vaginales suelen ser complicados debido a la diferencia entre el pH vaginal y el pH en el que los tratamientos convencionales son más efectivos⁽³²⁾.

Candida es una levadura, cuya incidencia se ha visto incrementada en los últimos años. Una composición sinérgica de propóleo y ácido carnósico ha demostrado ser beneficiosa para el tratamiento y la prevención de la candidiasis en las mucosas corporales. Las formulaciones se fabrican según la tecnología de semisólidos e incluyen preparaciones como emulsiones, geles, ungüentos, pastas e inclusive óvulos vaginales. A raíz de esta investigación se determinó que esta combinación puede ser aplicada en múltiples presentaciones y formas farmacéuticas las cuales están relacionadas con resultados positivos en seres humanos y en el área veterinaria⁽³³⁾.

Antivirales

En la actualidad, el Virus del Papiloma Humano (VPH) representa un riesgo inminente y una prevalencia que requiere atención. El interferón alfa es una molécula biológica que en formulación liposomal tópica ha demostrado disminuir las lesiones en el cuello uterino en pacientes que se encuentran en el tratamiento final por VPH. Se evidenció que el uso de liposomas de polietilenglicol para la encapsulación de interferón alfa genera un efecto mayor debido a un incremento de la penetración del fármaco. Lo cual es una estrategia prometedora para la entrega efectiva de fármacos en el epitelio vaginal⁽³⁴⁾.

Antimetabolitos

El cáncer de piel es una enfermedad que se ha relacionado con el desarrollo de formulaciones de aplicación dérmica. El 5-fluorouracilo es un agente antineoplásico que se logró incorporar en un gel liposomal de carbopol-980, para esto se realizaron pruebas que involucran estudios de preformulación y estudios in vitro para caracterizar la liberación liposomal, la permeación cutánea y el depósito del fármaco, los estudios in vivo se realizaron para evaluar la toxicidad de la formulación. Finalmente, se observaron mejores resultados en cuanto a la permeación y el depósito del fármaco, su seguridad y su efectividad⁽³⁵⁾.

El metotrexato se desarrolló como un agente quimioterapéutico para tratar algunos tipos de neoplasias malignas, además las dosis bajas de este son efectivas para el tratamiento de afecciones inflamatorias autoinmunes como la artritis reumatoide y la psoriasis. Según estudios *in vitro* e *in vivo* los nanoliposomas ultra deformables podrían ser portadores potenciales de metotrexato para el tratamiento con dosis bajas de la psoriasis y la artritis reumatoide, al tiempo que reducen los efectos adversos de la administración oral y parenteral⁽³⁶⁾.

Vitaminas

Las vitaminas son de gran importancia para la salud, algunas son esenciales para el correcto funcionamiento del organismo, razón por la cual han sido empleadas como medicamentos y productos farmacéuticos cosméticos⁽³⁷⁾. La vitamina C (ácido ascórbico) y sus derivados son una de las vitaminas que mayormente se usan en la industria cosmética, sin embargo, es una vitamina muy inestable, donde el pH, las temperaturas elevadas y/o la presencia de oxígeno disuelto pueden causar su degradación. Los liposomas constituyen una estrategia eficaz para prevenir estas causas de inestabilidad. Las formulaciones semisólidas cosméticas de aplicación tópica han hecho uso de liposomas cargados negativamente, liposomas de fosfatidilcolina, liposomas recubiertos de pectina, niosomas, sistemas de nanopartículas en gel, entre otras formulaciones, con el fin de mejorar la eficacia y estabilidad de la vitamina C⁽³⁸⁾.

Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del ácido ascórbico previenen el fotodaño de los queratinocitos. Sin embargo, su inestabilidad y baja penetración a través de la piel hacen que sea necesario el uso de un vehículo apropiado para obtener la eficacia deseada. Se realizó un estudio con el objetivo de investigar la capacidad de una formulación de liposomas de fosfatidilcolina de superar la barrera del estrato córneo y permitir la administración del agente activo en la dermis para evitar el fotodaño. Se utilizó piel abdominal de diez pacientes y la penetración de los liposomas de fosfatidilcolina se evaluó *ex vivo* por medio de fluoresceína y ascorbato de sodio. Los resultados obtenidos mostraron que los liposomas de fosfatidilcolina cargados de fluoresceína tienen una mejor difusión a través de la epidermis, mientras que los liposomas cargados con ascorbato mostraron una mejor difusión a través de la dermis. Los liposomas con ascorbato mostraron propiedades antioxidantes y antiinflamatorias preventivas en toda la piel humana irradiada con UVA/UVB⁽³⁹⁾.

El ácido retinoico (RA por sus siglas en inglés), es un metabolito del retinol y una de las formas biológicamente más activas de retinoides, desempeña papeles vitales en el desarrollo embrionario y en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Un estudio realizado en ratones demuestra que una preparación novedosa de liposoma-hidrogel tiene ventajas sinérgicas sobre cada componente por separado. El objetivo del estudio fue investigar las características del gel liposomal con ácido retinoico y se midió su morfología, tamaño de partícula, potencial Zeta y eficiencia de atrapamiento. También se determinó la viscosidad del liposoma-hidrogel de RA, la difusión a través de la piel del ratón, seguido de la investigación de los niveles de expresión de ARNm de Ker18, REX1 y α -FP usando Q-PCR. Los resultados mostraron que el liposoma-hidrogel RA penetra en la piel del ratón con eficacia⁽⁴⁰⁾.

Fitoquímicos

Los fitoquímicos corresponden a metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, que incluyen terpenos, ácidos fenólicos y tiólicos, lignanos, flavonoides, entre otros. Se ha demostrado que algunos de estos compuestos poseen propiedades farmacológicas y cosméticas⁽⁴¹⁾. Los liposomas han evidenciado facilitar la penetración dérmica de los principios activos por su similitud a la barrera cutánea. La planta *Croton draco* tiene usos medicinales debido a sus propiedades terapéuticas eficaces para el tratamiento de heridas, principalmente durante la cicatrización. Se realizó un estudio que evidenció el efecto sinérgico de formular un producto liposomal con el extracto etanólico de esta planta. La investigación evidenció las propiedades cicatrizantes de formulaciones semisólidas de uso tópico⁽⁴²⁾.

Otro estudio desarrolló un gel liposomal llamado “gel portador de lípidos nanoestructurados (NLC)” cargado con un fármaco dual de quercetina y resveratrol para mejorar su disposición en las capas dérmica y epidérmica de la piel. Durante el estudio, el gel NLC fue comparado con un gel convencional elaborado con carbopol que contenía los mismos principios activos. Los resultados obtenidos muestra-

ron evidencia de una mayor permeación en la piel tratada con gel NLC en comparación con la piel que fue tratada con el gel convencional. También se estudiaron las propiedades citotóxicas de ambos geles contra la línea celular de carcinoma epidermoide humano (A431), los resultados indican que el valor de IC50 del gel NLC fue de 86,50 μ M mientras que el valor obtenido con el gel convencional fue de 123,64 μ M. Estos resultados demuestran que el gel liposomal podría usarse como un vehículo potencial para la administración de quercetina y resveratrol en las capas más profundas de la piel y puede ser útil para el desarrollo de una formulación prometedora para el tratamiento contra el cáncer de piel⁽⁴³⁾.

Aplicaciones adicionales

Además de las aplicaciones previamente destacadas, se pueden agregar diferentes casos exitosos del uso de liposomas para el desarrollo de sistemas farmacéuticos semisólidos. Un ejemplo es la Anfoterina B, un antibiótico antimicótico utilizado en el tratamiento de leishmaniasis cutánea⁽⁴⁴⁾ que inicialmente era administrado únicamente por vía intravenosa. Sin embargo, mediante el uso de liposomas se adaptó el antibiótico para ser administrado a través de la piel, por medio de una formulación en gel⁽⁴⁵⁾. Finalmente, se determinó que las propiedades del gel fueron óptimas y evitan la absorción sistémica del gel, lo que permite alcanzar un efecto tópico y evitar la toxicidad sistémica^(44,45).

Por otra parte, existen múltiples enfermedades de la piel, como por ejemplo el acné y la psoriasis; y los retinoides desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de estas patologías dermatológicas. La terapia combinada representa múltiples beneficios para este tipo de padecimientos, en este caso los liposomas, gracias a su biodegradabilidad y escasos efectos tóxicos, fueron utilizados para la formulación de un gel tópico de ácido retinoico y de betametasona indicado para el tratamiento de psoriasis. La elaboración de estas formulaciones liposomales debe considerar las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los principios activos con el objetivo de obtener las características idóneas de los liposomas y facilitar el cumplimiento de los objetivos de la formulación. Finalmente, este estudio evidencia una mejora en el efecto farmacológico, lo que permite considerar esta formulación como una opción de tratamiento novedosa⁽⁴⁶⁾.

La hiperpigmentación de la piel es causada por una producción excesiva de melanina. Se han estudiado alternativas para disminuir esta condición de la piel, entre estas se ha evaluado la cisteamina que es conocida como un agente despigmentante. En estudios in vitro se evaluó la actividad despigmentante y la penetración cutánea de formulaciones liposomales con clorhidrato de cisteamina encapsulado. En este estudio se demostró que la formulación no fue citotóxica en las concentraciones seleccionadas, que la encapsulación de la cisteamina aumentó la penetración a través de la piel, la retención en la epidermis y la estabilidad de la molécula⁽⁴⁷⁾.

En la actualidad, se conocen múltiples formas farmacéuticas cuyo principio activo se encuentra encapsulado en liposomas, utilizando diferentes tecnologías para su formulación y aplicación a través de los años⁽⁴⁸⁾. Un ejemplo clave es el gel de imiquimod, el cual, mediante la incorporación de liposomas en la formulación, mejora la absorción transdérmica y disminuye la toxicidad ligada al fármaco⁽⁴⁹⁾. Por otra parte, la formulación de una sal sódica de heparina en forma de gel es otro caso patentado que se puede destacar. En el mercado existen formulaciones semisólidas destinadas a la administración dérmica de heparina, utilizados por ejemplo en venas varicosas, riesgo de trombosis venosa superficial o bien en dermatocósmica. Estas formulaciones liposomales con heparina y una mezcla de enzimas proteolíticas encapsuladas, se asocian con una mayor permeación y por lo tanto mayor eficacia del principio activo⁽⁵⁰⁾.

En cuanto a los agentes antisépticos, estos pueden incorporarse mediante preparaciones liposomales en hidrogeles, los cuales son un vehículo muy adecuado que se relaciona con una actividad tópica amplia, un ejemplo clave es la povidona yodada encapsulada en liposomas para administrarse en una formulación en hidrogel⁽⁵¹⁾. También se destaca el azufre liposomal en preparaciones semisólidas para el tratamiento de enfermedades dermatológicas. Bajo esta invención se mejoran las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del azufre, lo que genera una formulación con buenas propiedades organolépticas, permite el control de la liberación de la dosis, evita efectos tóxicos y se relaciona con mayor tolerabilidad y facilidad de aplicación. Estas invenciones se relacionan con múltiples ventajas galénicas y tecnológicas que benefician la clínica y farmacoterapia de las enfermedades seborreicas en la piel⁽⁵²⁾.

Conclusión

La nanotecnología aplicada en la formulación de fármacos constituye una herramienta exitosa. El uso de liposomas en las formas farmacéuticas semisólidas demuestran ser una opción eficaz para la administración por vía tópica de diversos principios activos. Los estudios consultados evidencian que los fármacos presentes en las formulaciones semisólidas liposomales logran atravesar la piel eficientemente para ejercer sus efectos farmacológicos en el tratamiento de distintas enfermedades. Además, la vía de administración tópica o a través de la piel es una alternativa sencilla, rápida e indolora para los pacientes. Por lo tanto, es importante que se continúe con el desarrollo de estudios y formulaciones liposomales de uso tópico que permitan alcanzar la seguridad y eficacia de diferentes terapias.

Bibliografía

1. Field D, Palastanga N. Anatomía y movimiento humano. Paidotribo Editorial; 2001.
2. Natsheh H, Touitou E. Phospholipid vesicles for dermal/transdermal and nasal administration of active molecules: The effect of surfactants and alcohols on the fluidity of their lipid bilayers and penetration enhancement properties. *Molecules* [Internet]. 2020;25(13):2959. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25132959>
3. Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2013;65(2):152–68. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.003>
4. Panahi Y, Farshbaf M, Mohammadhosseini M, Mirahadi M, Khalilov R, Saghfi S, et al. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* [Internet]. 2017;45(4):788–99. Doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1282496>
5. Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS, Perrie Y. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2020;154–155:102–22. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>
6. Oropesa-Nuñez R, Jáuregui-Haza UJ. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *CENIC* [internet].2012;43(3). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/236649980_Las_nanoparticulas_como_portadores_de_farmacos_caracteristicas_y_perspectivas_Nanoparticles_as_drug_carriers_characteristics_and_perspectives
7. Bnyan R, Khan I, Ehtezazi T, Saleem I, Gordon S, O'Neill F, et al. Surfactant effects on lipid-based vesicles properties. *J Pharm Sci* [Internet]. 2018;107(5):1237–46. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.005>
8. Almeida B, Nag OK, Rogers KE, Delehanty JB. Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery. *Molecules* [Internet]. 2020;25(23):5672. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25235672>
9. Souto EB, Macedo AS, Dias-Ferreira J, Cano A, Zielińska A, Matos CM. Elastic and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(18):9743. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22189743>
10. Ghanbarzadeh S, Arami S. Enhanced Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium via Conventional Liposomes, Ethosomes, and Transfersomes. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013;2013:1–7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/616810>
11. Bhatia A, Goni V, Chopra S, Singh B, Katare OP. Evaluation of efficacy and safety of a novel lipogel containing diclofenac: A randomized, placebo controlled, double-blind clinical trial in patients with signs and symptoms of osteoarthritis. *Contemp Clin Trials Commun* [Internet]. 2020;20(100664):100664. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conctc.2020.100664>
12. Cevec, G, Vierl, U. NSAID formulations, based on highly adaptable aggregates, for improved transport through barriers and topical drug delivery. Estados Unidos; US 7473432B2, 2009.

- 13.** Sacha M, Faucon L, Hamon E, Ly I, Haltner-Ukomadu E. Ex vivo transdermal absorption of a liposome formulation of diclofenac. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;111:785–90. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.079>
- 14.** Moghimipour E, Salami A, Monjezi M. Formulation and evaluation of liposomes for transdermal delivery of celecoxib. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* [Internet]. 2015;10(1):e17653. Doi: <http://dx.doi.org/10.17795/jjnpp-17653>
- 15.** Gaur PK, Mishra S, Aeri V. Formulation and evaluation of guggul lipid nanovesicles for transdermal delivery of aceclofenac. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2014;2014:534210. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/534210>
- 16.** Sharma G, Saini MK, Thakur K, Kapil N, Garg NK, Raza K, et al. Aceclofenac cocrystal nanoliposomes for rheumatoid arthritis with better dermatokinetic attributes: a preclinical study. *Nanomedicine (Lond)* [Internet]. 2017;12(6):615–38. Doi: <http://dx.doi.org/10.2217/nnm-2016-0405>
- 17.** Dávila E, De Villa C, Morejón Hernández JM, Figueredo EA. Dolor y analgésicos. Algunas consideraciones oportunas. *Medisur* [Internet]. 2020;18(4):694–705. Disponible en: <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4742>
- 18.** Iwaszkiewicz K, Hua S. Development of an effective topical liposomal formulation for localized analgesia and antiinflammatory actions in the Complete Freund's Adjuvant rodent model of acute inflammatory pain. *Pain Physician* [Internet]. 2014;6;17(6;12):E719–35. Disponible en: <https://www.painphysicianjournal.com/current/pdf?article=MjE5Mw%3D%3D&journal=85>
- 19.** Hua S. Comparison of in vitro dialysis release methods of loperamide-encapsulated liposomal gel for topical drug delivery. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2014;9:735–44. Doi: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S55805>
- 20.** Kurakula M, Srinivas C, Kasturi N, Diwan P. Formulation and Evaluation of Prednisolone Proliposomal Gel for Effective Topical Pharmacotherapy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* [Internet]. 2012;4(1): 35-43. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Mallesh-Kurakula/publication/289098891_Formulation_and_Evaluation_of_Prednisolone_Proliposomal_Gel_for_Effective_Topical_Pharmacotherapy/links/6075c561299bf1f56d55e91c/Formulation-and-Evaluation-of-Prednisolone-Proliposomal-Gel-for-Effective-Topical-Pharmacotherapy.pdf
- 21.** El Kechai N, Mamelie E, Nguyen Y, Huang N, Nicolas V, Chaminade P, et al. Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear. *J Control Release* [Internet]. 2016;226:248–57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916300657>
- 22.** Franz-Montan M, Baroni D, Brunetto G, Sobral VRV, da Silva CMG, Venâncio P, et al. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. *J Liposome Res* [Internet]. 2015;25(1):11–9. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262149495_Liposomal_lidocaine_gel_for_topical_use_at_the_oral_mucosa_Characterization_in_vitro_assays_and_in_vivo_anesthetic_efficacy_in_humans
- 23.** Wang J, Zhang L, Chi H, Wang S. An alternative choice of lidocaine-loaded liposomes: lidocaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for local anesthetic therapy. *Drug Deliv* [Internet]. 2016;23(4):1254–60. Doi: <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2016.1141259>
- 24.** Hood R, Kendall E, Devoe D, Finkel J, Junqueira M & Quezado, Z. Nano-Liposomal Formulations and Method Of Use. Estados Unidos; WO 2014/144365 A1, 2014.
- 25.** Hsu C-Y, Yang S-C, Sung CT, Weng Y-H, Fang J-Y. Anti-MRSA malleable liposomes carrying chloramphenicol for ameliorating hair follicle targeting. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2017;12:8227–38. Doi: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S147226>
- 26.** Thapa RK, Winther-Larsen HC, Ovchinnikov K, Carlsen H, Diep DB, Tønnesen HH. Hybrid hydrogels for bacteriocin delivery to infected wounds. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2021;166(105990):105990. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105990>

27. Gao W, Vecchio D, Li J, Zhu J, Zhang Q, Fu V, et al. Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. *ACS Nano* [Internet]. 2014;8(3):2900–7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/nn500110a>
28. Villegas E. Composición de doxiciclina en liposomas para la prevención, mejora y/o tratamiento de patologías oculares. España; WO 2016/046442 A1, 2016.
29. Asadi P, Mehravaran A, Soltanloo N, Abastabar M, Akhtari J. Nanoliposome-loaded antifungal drugs for dermal administration: A review. *Curr Med Mycol* [Internet]. 2021;7(1):71–8. Doi: <http://dx.doi.org/10.18502/cmm.7.1.6247>
30. Verma S, Utreja P. Vesicular nanocarrier based treatment of skin fungal infections: Potential and emerging trends in nanoscale pharmacotherapy. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2019;14(2):117–29. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2018.05.007>
31. Elmoslemany RM, Abdallah OY, El-Khordagui LK, Khalafallah NM. Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2012;13(2):723–31. Doi: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-012-9783-6>
32. İzgü F, Bayram G, Tosun K, İzgü D. Stratum corneum lipid liposome-encapsulated panomycocin: preparation, characterization, and the determination of antimycotic efficacy against *Candida* spp. isolated from patients with vulvovaginitis in an in vitro human vaginal epithelium tissue model. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2017;12:5601–11. Doi: <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s141949>
33. Lozano JA, Argüelles JC, Argüelles A, Sánchez-Fresneda R, Guirao A. Composición sinérgica que comprende propóleo y ácido carnósico para uso en la prevención y el tratamiento de candidiasis. España; WO 2016/124957 A1, 2016.
34. Jøraholmen MW, Basnet P, Acharya G, Škalko-Basnet N. PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017;113:132–9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.02>
35. Hussain A, Samad A, Ramzan M, Ahsan MN, Ur Rehman Z, Ahmad FJ. Elastic liposome-based gel for topical delivery of 5-fluorouracil: in vitro and in vivo investigation. *Drug Deliv* [Internet]. 2016;23(4):1115–29. Doi: <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2014.976891>
36. Zeb A, Qureshi OS, Kim H-S, Cha J-H, Kim H-S, Kim J-K. Improved skin permeation of methotrexate via nanosized ultradeformable liposomes. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2016;11:3813–24. Doi: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S109565>
37. Carrera-Castro, C. En la naturaleza está la respuesta: “Micronutrientes: las vitaminas, agentes terapéuticos en las heridas”. *Enfermería Global* [internet]. 2013; 31:273-289. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/eg/v12n31/revision1.pdf>
38. Brignone SG, Ravetti S, Palma SD. Efectos biológicos de la Vitamina C y su implicancia en el diseño de formulaciones tópicas. *Rescifar* [Internet]. 2020;1(2):169-82. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/142293/CONICET_Digital_Nro.e8b2d3ac-454a-4adb1-8a5c-716de88c22ee_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
39. Serrano G, Almudéver P, Serrano J-M, Milara J, Torrens A, Expósito I, et al. Phosphatidylcholine liposomes as carriers to improve topical ascorbic acid treatment of skin disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol* [Internet]. 2015;8:591–9. Doi: <http://dx.doi.org/10.2147/CCID.S90781>
40. Xia H, Cheng Y, Xu Y, Cheng Z. Retinoic acid liposome-hydrogel: preparation, penetration through mouse skin and induction of F9 mouse teratocarcinoma stem cells differentiation. *Braz J Pharm Sci* [Internet]. 2015;51(3):541–9. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/5mM4ZtBbS7LwWbd7fnvJ-Tpw/?format=pdf&lang=en>
41. Gasaly N, Riveros K, Gotteland M. Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2020;47(2):317–27. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v47n2/0717-7518-rchnut-47-02-0317.pdf>

42. Arguedas E, Cruz M, Romero G. El uso de Croton Draco como una alternativa coadyuvante en el tratamiento de heridas generando un efecto sinérgico con liposomas. InvestFarma® Unibe.ac.cr. [Internet]. 2021;2:9-17. Disponible en: <http://www.unibe.ac.cr/ojs/index.php/InvestFarma/article/view/122/125>
43. Imran M, Iqbal MK, Imtiaz K, Saleem S, Mittal S, Rizvi MMA, et al. Topical nanostructured lipid carrier gel of quercetin and resveratrol: Formulation, optimization, in vitro and ex vivo study for the treatment of skin cancer. Int J Pharm [Internet]. 2020;587(119705):119705. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851732030689X>
44. Jaafari MR, Hatamipour M, Alavizadeh SH, Abbasi A, Saberi Z, Rafati S, et al. Development of a topical liposomal formulation of Amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Int J Parasitol Drugs Drug Resist [Internet]. 2019;11:156–65. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.09.004>
45. Berenguer D, Alcover MM, Sessa M, Halbaut L, Guillén C, Boix-Montañés A, et al. Topical amphotericin B semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: Physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. Pharmaceutics [Internet]. 2020;12(2):149. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12020149>
46. Wang W, Shu G-F, Lu K-J, Xu X-L, Sun M-C, Qi J, et al. Flexible liposomal gel dual-loaded with all-trans retinoic acid and betamethasone for enhanced therapeutic efficiency of psoriasis. J Nanobiotechnology [Internet]. 2020;18(1):80. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-020-00635-0>
47. Atallah C, Viennet C, Robin S, Ibazizen S, Greige-Gerges H, Charcosset C. Effect of cysteamine hydrochloride-loaded liposomes on skin depigmenting and penetration. Eur J Pharm Sci [Internet]. 2022;168(106082):106082. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106082>
48. Pozo D, Klippstein R, González R, Trigo I y Vargas de los Monteros M. Nanoliposomas funcionalizados con péptidos. España; WO 2012/101309 A1, 2012.
49. 时军张慧迪吴艳婷. A kind of liposome gel formulation and its preparation and use for suppressing scar proliferation. China; CN 107137345A, 2017.
50. Bilmin K, Grieb P, Szopiński P, Lagner M, Przybylo M. Gel form of heparin sodium salt for dermal administration, and a method for its preparation. Polonia; WO 2015/181746 A1, 2015.
51. Scherer S, Wagner C, Leuner C & Fleischer W. Hydrogel. Estados Unidos; US 9415133 B2, 2016.
52. González P. Composición de azufre liposomado. España; WO 2015/114194 A1, 2015.

doi: 10.30827/ars.v63i4.25208

Artículos de revisión

Recent advancements in Cancer Targeting Therapy with the Hyaluronic Acid as a Potential Adjuvant

Avances recientes en la terapia dirigida al cáncer con el ácido hialurónico como adyuvante potencial

Garima Gupta¹  0000-0001-5933-1777

Pulkit Asati¹  0000-0001-8552-3414

Pranjul Jain²  0000-0001-5623-6192

Pranali Mishra²  0000-0002-6040-5232

Ankit Mishra²  0000-0003-0795-8417

Pradeep Singour²  0000-0001-5391-9617

¹Banaras Hindu University, Indian Institute of Technology, Department of Pharmaceutical Eng. & Technology Varanasi, India.

²VNS Group of Institutions, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Bhopal, India.

Correspondence

Mishra Ankit
mishraaa@gmail.com

Recibido: 28.06.2022

Aceptado: 25.09.2022

Publicado: 28.09.2022

Funding

Authors don't have any funding in this project and manuscript.

Conflict of interest

Authors don't have any conflict of interest.

Resumen

Introducción: El compuesto natural no sulfatado, el ácido hialurónico (HA), es un mucopolisacárido que tiene un papel esencial en la biología celular, es un elemento fundamental de la célula viva. Ha juega un papel esencial en la administración dirigida de medicamentos, recientemente ha adquirido mucha atención debido a varias ventajas como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la no inmunogenicidad y la no toxicidad.

Métodos: Esta revisión narrativa se basa en la literatura buscada en PubMed y la base de datos de Elsevier desde enero a mayo de 2021 utilizando las siguientes palabras clave: "Hyaluronic acid", "Hyaluronic acid in cancer therapy", "Hyaluronic acid in cancer targeting", "Hyaluronic acid in drug targeting". Se consideraron las investigaciones publicadas en los últimos cinco años, sin embargo, en las referencias cruzadas, no se siguió tal línea de tiempo.

Resultados: A partir de la literatura, se encuentra que HA puede reconocer distintos receptores que se revelan anormalmente en grandes cantidades en la superficie exterior de tejidos o células cancerosas; por lo tanto, se puede usar para la conjugación con fármacos contra el cáncer, lo que facilita su actividad terapéutica mejorada sobre las células cancerosas que las células normales. También se encuentra que los sistemas de administración de fármacos basados en HA proporcionan mayor estabilidad y solubilidad de los agentes anticancerígenos en entornos biológicos. Con base a estos hallazgos y ventajas, el HA se ha investigado abundantemente como un biomaterial prometedor para la evolución de varios sistemas de administración como micelas, liposomas, hidrogeles, nanopartículas, etc. Según investigaciones recientes, el sistema basado en HA proporciona inmunoterapia, terapia génica, quimioterapia dirigida y terapia combinada con enormes aplicaciones en la evolución de una terapia altamente eficaz y rentable para el tratamiento del cáncer.

Conclusión: Esta revisión evalúa y resume los enfoques y estrategias recientes para diseñar y evolucionar diversos sistemas de administración de fármacos basados en la HA para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: Ácido hialurónico, cáncer; Administración/ dosificación; nanopartículas; Terapia combinada

Abstract

Introduction. The non-sulfated natural compound, Hyaluronic acid (HA), is a mucopolysaccharide that has an essential role in cellular biology; it is a fundamental element of the living cell. HA plays an essential role in targeted drug delivery; it has recently acquired much attention because of various advantages like biocompatibility, biodegradability, non-immunogenicity, and non-toxicity.

Methods. This narrative review is based on the literature searched with keywords Hyaluronic acid, Hyaluronic acid in cancer therapy, Hyaluronic acid in cancer targeting, Hyaluronic acid in drug targeting, was done on PubMed and Elsevier database from January to May 2021. Research published in the last five years was considered; however, no such timeline is followed in cross-referencing.

Results. From the literature, it is found that HA can recognize distinct receptors that are abnormally revealed in large numbers on the outer surface of cancerous tissues or cells; hence can be used for conjugation with anticancer drugs, facilitating their enhanced therapeutic activity over the cancer cells than normal cells. It is also found that HA-based systems also provide increased stability and solubility of anticancer agents in biological surroundings. Based on these findings and advantages, HA is conjugated with various delivery systems like micelles, liposomes, hydrogels, nanoparticles, etc. As per recent research, the HA-based system provides immunotherapy, gene therapy, targeted chemotherapy, and combination therapy with enormous applications in the evolution of highly efficacious and cost-effective therapy for the ministration of cancer.

Conclusion. In this context, various literatures on HA as adjuvant for drug delivery system for cancer targeting represents the HA as a potential adjuvant for cancer treatment.

Keywords: Hyaluronic acid; Cancer; Administration & dosage; Nanoparticles ; Combined Modality Therapy

Highlights

- Hyaluronic acid (HA), is a mucopolysaccharide present in almost all living beings, and has an essential role in cellular biology.
- HA has advantages like biocompatibility, biodegradability, non-immunogenicity, and non-toxicity.
- HA can recognize distinct receptors that are abnormally present in large numbers on the outer surface of cancerous tissues or cells.

- HA is a promising biomaterial for the targeted delivery of anticancer agents alone or in combination with various other delivery systems like micelles, liposomes, hydrogels, and nanoparticles.

Introduction

Cancer is a disorder with uncontrolled cell growth and proliferation, which can sometimes be followed by metastasis. A neoplasm or tumor is a collection of cells that have grown out of control. They might form a lump or a mass but can also be dispersed⁽¹⁾.

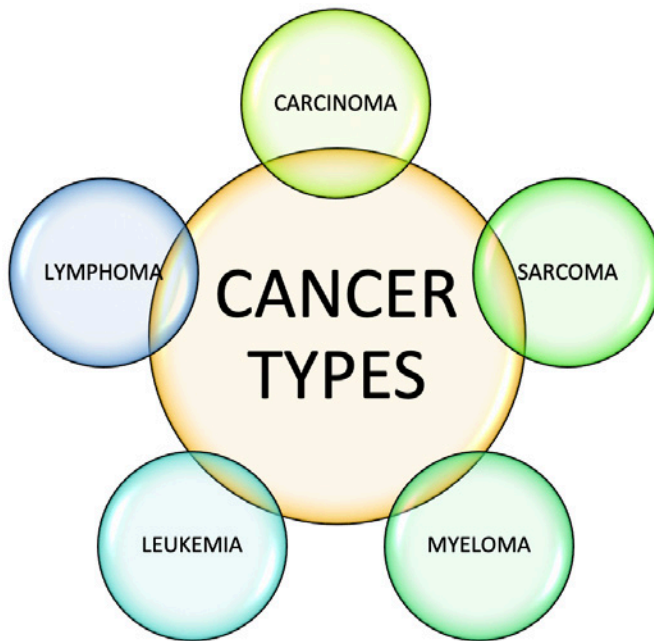


Fig 1- Classification of Cancer-based on histological characteristics⁽²⁾

It is considered one of the fatal diseases, accounting for approximately 6 lakh deaths in 2020, and it was expected that this statistic would increase in millions in the next ten years. A coarser classification of histological based cancer is diagrammatically presented in Fig 1⁽³⁻⁶⁾.

The establishment of successful cancer treatment has become the priority of researchers in the medical field. Chemotherapy is widely used as it involves drugs that regulate various mechanistic pathways like paclitaxel, docetaxel, doxorubicin, cisplatin, etc.⁽⁷⁾. However, chemotherapy is associated with systemic toxicity like nausea, fatigue, neutropenia, thrombocytopenia, etc.⁽⁸⁾. To overcome these limitations, the chemotherapeutics were coupled with materials or macromolecular ligands that would selectively bind with the expressed or overexpressed receptors macromolecules, on the outer surface or into the interior of diseased cancerous cells and hence facilitate the localization of drug at the target site reducing the undesirable effects as well as the dose of the chemotherapeutic agents for maintaining the required concentration at the desired target site.⁽⁹⁾ Various targeting materials were analyzed, and based on the biocompatibility and biodegradability properties, much attention was given to natural degradable polymers⁽¹⁰⁾.

Nanotechnology can precisely target anticancer agents to cancerous cells, lead to selective tumor degradation, and increase the therapeutic safety and effectiveness of all types of cancer therapy available.

Glycosaminoglycans (GAGs), an amino group-containing, non-complex polysaccharide, are made up of 2 distinct monosaccharide moieties attached in a repeated manner (uronic acid followed by an amino sugar (N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine)). GAGs are found on the outer surface of cell membranes and in the interior site of cells. GAGs are essential in cell signalling, including cell growth, proliferation, cell adhesion enhancement, anticoagulation, and wound healing. They bind and regulate different proteins. Example of the most explicit Glycosaminoglycans includes: - keratan sulfate, chondroitin sulfate, heparan sulfate, heparin, and hyaluronic acid. Among all GAGs, the hyaluronic acid (HA) structure is the most straightforward because it does not have the sulfation of functional groups. This sulfation of the functional group occurs in the golgi apparatus for the other GAGs⁽¹¹⁾.

Methods

This narrative review is based on the literature searched in PubMed and the Elsevier database from January to May 2021 using the following keywords: “Hyaluronic acid”, “Hyaluronic acid in cancer therapy”, “Hyaluronic acid in cancer targeting”, “Hyaluronic acid in drug targeting”. Research published in the last five years was considered; however, no such timeline is followed in cross-referencing.

Results and Discussions

HA was first discovered as a non-complex linear-shaped biomolecule (polymer) from bovine eyes in 1934.⁽¹⁰⁾ It is considered the vital portion of the extracellular matrix (ECM). It was further reported that HA plays a vital role in cell survival and maintains the structural wholeness, integrity, and stability of the cells and tissues.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Cancer cells show abnormal accumulation of a large number of receptor proteins on the outer surface of a cell membrane that can recognize and bind to HA, as compared to normal cells, like the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM), the lymphatic vessel endocytic receptor (LYVE-1), and cell differentiation 44 (CD44) which supports the concept of HA-mediated selective tumor targeting.⁽¹⁵⁾

Chemical coupling of an anticancer drug with HA works by altering both the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drug. Coupling alters the solubility of the drug, altering release from formulation also its distribution in the body. This alteration in solubility can also increase the concentration at the site of action, which finally increases the pharmacological benefits of the drugs.⁽¹⁶⁾ Further study revealed that HA became a suitable candidate for chemical modification due to specific functional groups like hydroxyl, carboxyl, and N-acetyl, contributing to increased absorption, sustained release, improved drug targeting, etc. In this review, a brief discussion on using HA-based drug delivery systems to mitigate some previous problems associated with non-targeted delivery of toxic antineoplastic agents is also done.⁽¹⁷⁾

Source and structure of HA

HA was first recognized in 1934 by Meyer and Palmer and identified chemically in 1936.⁽¹⁸⁾

Sources of HA:

The sources of HA include tissues and fluids of vertebrates, ECM, and some species of bacteria. At the tissue level, HA is present in connective tissues like synovial medium, vitreous body, umbilical cord, and in integuments, cock's combs, the dorsal fin of amphibians, brood spot of the birds, reproductive skin of monkeys, and the sex organs of fish, birds, and mammals. However, the HA content of the vitreous body of mammals and birds was found to get increased with age.^(19,20) The HA is also found in an intercellular matrix, golgi complex, synoviocytes (integumentary cells of the synovial membrane), vacuoles, and fibroblasts. In addition, HA is also regarded as a component of articular cartilage and skin. The bacteriological source includes hemolytic *streptococci* strains A and B.⁽²¹⁾

Structure of HA:

HA is an anionic linear mucopolysaccharide with molecular weight ranging from 4 – 2000 k Daltons.⁽²²⁾ It is chemically made up of alternate two monosaccharide units of N- acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid and linked by glucuronide bonds and glucosaminide bonds via respectively β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 4). In other words, HA is mentioned as a homopolymer of the hyaluronic acid, a disaccharide. The structure represented in Fig 2, suggests that HA does not possess intramolecular covalent bonds.⁽²³⁾

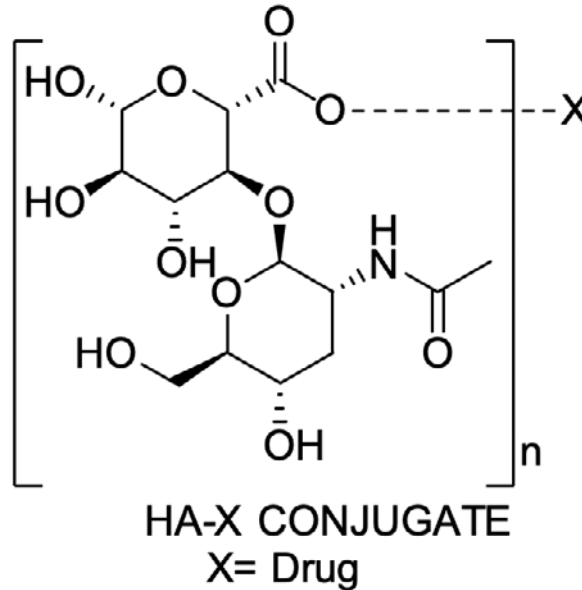


Fig 2- Depicting conjugation of Hyaluronic Acid with the Anti-Cancer Drugs

Extraction and isolation of HA

The first isolation of HA took place in 1934 by Meyer. He isolated HA from the vitreous body of cattle, performing an aqueous-acetone extraction process.⁽¹⁸⁾ Selyanin et al. (2015) reported that Sewage also isolated HA in the same year but from human umbilical cords using an aqueous-chloroform extraction process. In 1936, HA was isolated from pig eyes' vitreous bodies and bovine blood.⁽²⁴⁾ For the first time, bacterial isolation was performed in 1937 by Kendall et al., including hemolytic *streptococci* sp. Up till now, many forms of isolation and extraction processes existed. However, all extraction methods deal with two common principles; first, the HA must undergo sequential breaking of its structures at each stage of localization, including homogenization, crushing, etc. Second, the HA must experience maximum contact with the extractants. It was found that the integrity of cellular structures of HA was broken down in disintegrators or by enzymatic action, or by using organic solvents and detergents, facilitating the isolation of HA from the complexes with other mucopolysaccharides and proteins⁽²¹⁻²³⁾.

HA is extracted from tissues after the removal of traces of blood. Tissues are treated either with acetone or 95% ethanol in chloroform or with 90% acetic acid with sodium acetate. Washing is performed about 5-10 times till a clear solution is obtained. After washing, to avoid oxidative destruction, the washed tissues were either kept conserved in 95% v/v ethanol in a chamber having a temperature range of 4-22°C or subjected to a dried stream of acetone for an extended period. The obtained tissues were then crushed, dried, and swollen in 95% v/v ethanol or distilled water. Then the eye's vitreous body and joints synovial fluid were purified from the treated tissue and were filtered. The extraction of HA from marine sources- fish eye is represented though a flowchart in Fig 3⁽²³⁾.

Extraction of HA from HA-protein complex occurs by (a) ultrafiltration, (b) Electro-dialysis, (c) Precipitating with cetylpyridinium, (d) Extraction with 90% phenol, sodium acetate, or chloroform-amyl alcohol mixture, (e) hydrolysis by papain enzyme, and (f) adsorption on activated charcoal. On the other hand, extraction of HA from HA- mucopolysaccharide complex occurs by (a) Electrophoresis, (b) Hydrolysis by enzymes, namely papain, trypsin, and pronase, or by 18 % HCl, (c) Precipitating with cetylpyridinium chloride, (d) Ion-exchange chromatography, and (e) Addition of salts of heavy metals.

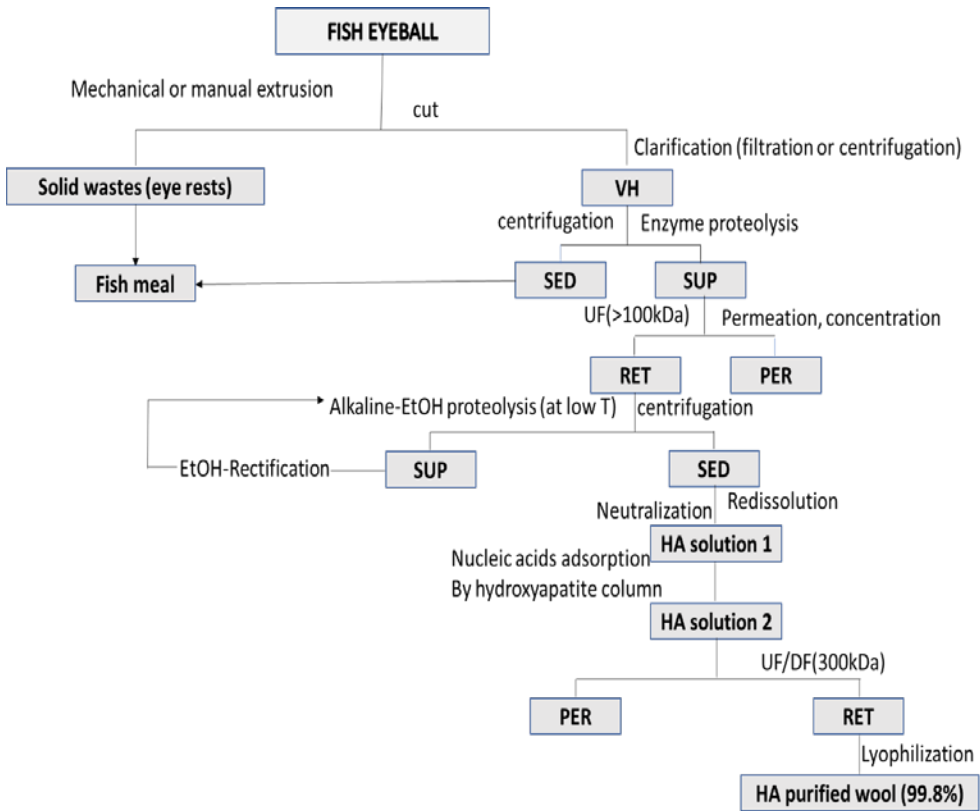


Fig 3- Flowchart depicting the extraction of Hyaluronic Acid from Marine sources (Fish)

Captions - HA: - Hyaluronic Acid; VH: - Vitreous Humor; SED: - Sediment; SUP: - Supernatant; PER: - Permeate; RET: - Retentate; UF/DF: - Ultrafiltration-Diafiltration technologies; Et OH: - Ethyl Alcohol

The extracted HA is again subjected to reprecipitation with ethanol and cetylpyridinium chloride, followed by sterile acetone washing. The residue is then concentrated in a lyophilic dryer or vacuumed over phosphorus pentoxide. The purified and isolated HA obtained are stored at a temperature not more than - 18° C in dry form.⁽²³⁾

Significance of HA in cancer therapy

The tumor microenvironment is becoming increasingly important in determining neoplastic cell aggressiveness. The glycosaminoglycan hyaluronan is a major component of the tumor stroma and the surfaces of cancer cells, and its increase can significantly impact patient survival. HA is abnormally over-expressed by the vast number of cancerous cells, specifically tumor-developing cells. Since HA is implicated in various cancer-related malignancies (including enhanced cell proliferation, migration, in-

vasion, angiogenesis, and chemo-resistance), blocking HA synthesis/signaling or reducing HA in tumor stroma might be a viable treatment approach for oncogenesis. The capacity of hyaluronan to interact with numerous signaling receptors, which frequently activate pro-angiogenic and pro-tumorigenic intracellular pathways, determines its activity. CD44 receptor that can recognize and bind with HA is over-expressed in pro-oncogenic and oncogenic cells and is associated with tumor progress, metastasis, and infiltration. The process is expressed in Fig 4. As a result, high levels of HA are identified in various types of cancer.

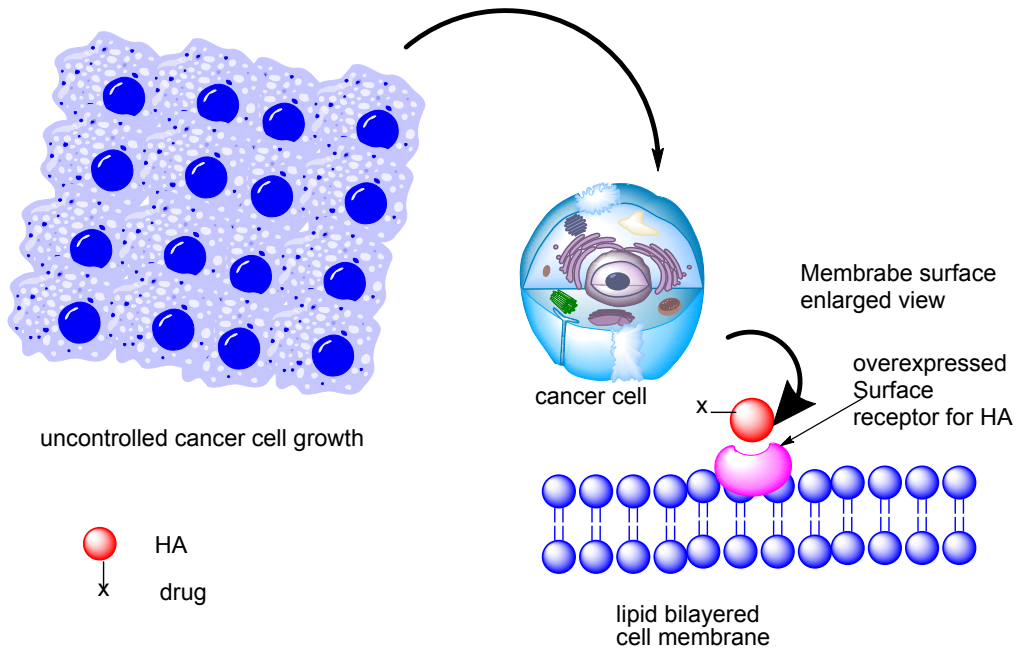


Fig 4 - Depicting HA-mediated selective tumor targeting by overexpressed cell surface receptors- CD44, RHAMM, LYVE-1.

Role of HA in Cancer Chemotherapy

The presence of specific hydrophilic functional groups in HA, like hydroxyl, carboxyl, and acetamido groups, enabled intracellular hydrogen bonds, which provide polarity, hydrophilicity, and enhanced solubility of the molecule or drug. Such properties were used in the self-assembling of micelles and nanoparticles. The pKa of the carboxyl group is within 3-4, which allows HA to get dissociated in the physiological conditions. Hence, HA is a negatively charged anionic biomaterial that can react and combine with positively charged cations like sodium or potassium ions in the biological fluids to form respective hyaluronates. These properties support carriers' improved loading capacity, controlled drug release, and increased active targeting^(12,25).

HA could be conjugated with the drug directly by a covalent bond to form HA-drug conjugates, which are not easily hydrolyzed or enzymolysis in the circulation, facilitating effective targeting and release of the drug. Such conjugates also enhance the drug's solubility, distribution, and half-life, enhancing the osmotic retention effect and increasing drug concentration at a site or near the cancerous cells, showing better drug efficacy. Various cancers in which HA is used as carrier is presented in Fig 5.⁽²⁶⁾

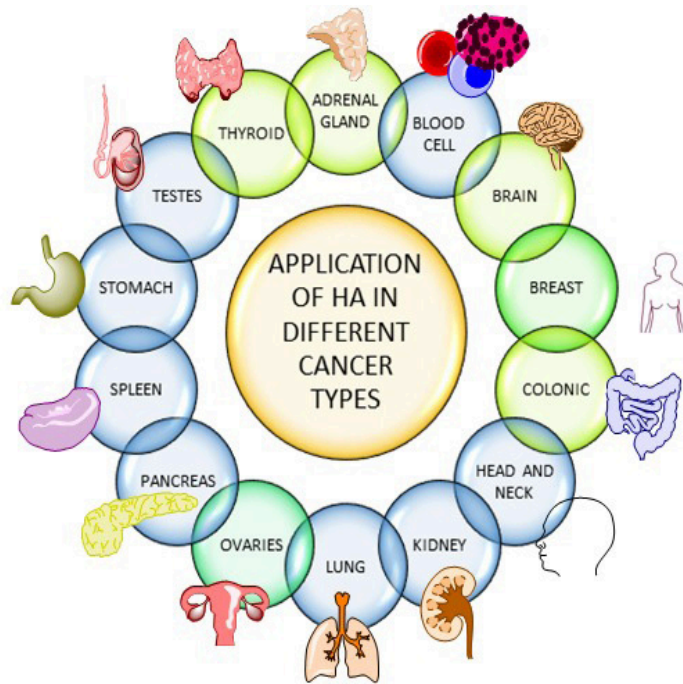


Fig 5- Role of HA in different Cancer types

It was observed that these conjugates provide controlled release and targeted effect. The tolerable alterations in the chemical structure of HA could be done on the three principal functional groups, i.e., carboxyl, hydroxyl, and acetylamino groups, which are responsible for the activity. Cai et al. evolved a delivery system by chemically connecting the antiproliferative drug cisplatin to HA, increasing the cisplatin concentration in lymphatic vessels, reducing systemic toxicity, and preventing early metastasis.⁽²⁶⁾ Similarly, Xin et al. (2010) developed HA-amino acid- paclitaxel conjugate by conjugating HA with paclitaxel via an amino acid-based cross-linker. It was observed that the presence of amino acids in the conjugates promoted the activity of esterase upon the conjugate, which enabled rapid release of paclitaxel, resulting in the early onset of action. Thus, it could be stated that HA-drug conjugation can switch or regulate the drug's release profile and rate, influencing the therapeutic activity of cytotoxic antitumor drugs.⁽²⁷⁾

Some instances show that some drug delivery carriers are surface-functionalized with HA, which aids in extending the circulation time of the carrier because of the biological origin of the HA, resulting in a sustained release pattern of the drug molecule from the drug delivery system⁽²⁸⁾. In a very similar manner, HA- modified polylactic acid-glycolic acid copolymer nanoparticles (HCDs) were developed that showed $\approx 80\%$ cumulative drug release in vitro in 14 days, indicating a sustained release profile, also showed an increased cellular uptake by cancer cells indicating an effective antitumor activity⁽²⁹⁾.

Another concept in drug release and target effect via HA deals with its degradation by intracellular hyaluronidase or other enzymes. This concept became apparent from work conducted by Chen et al. (2018) where he prepared HA-coated Zr (IV)-based porphyrinic metal-organic framework (PZM) nanoparticle loaded with α -cyano- 4- hydroxycinnamate (CHC), monocarboxylate transporter 1 (MCT1) inhibitor molecule. HA facilitated the active targeting of the nanocarrier to the tumor cells. After reaching the target site, the system gets attacked by the hyaluronidase enzymes that degrade HA and release drugs to inhibit the activity of MCT1⁽³⁰⁾. Similarly, Gotov et al. (2018) prepared Docetaxel-loaded Gold nanoparticles (AuNPs), surface covered with HA via a linker molecule, cathepsin B-cleavable peptide (GFLGC).

It was observed that HA improved the targeting of the AuNP in the diseased cancerous cells site, where the required high concentration of cathepsin B detached the GFLGC-linked HA via proteolysis, resulting in a sudden release of DTX and increased antineoplastic effect⁽³¹⁾. Hence, it could be inferred that HA is a versatile biomaterial that could be morphed either by modifying the functional groups within the structure or by surface functionalization via some linkers or polymers, resulting in modifying the release rate of the drugs as well as triggering active targeting in the tumor microenvironment.

Application of HA in cancer therapy

HA comprises distinct functional groups that help encapsulate active drugs or adsorption of macromolecules⁽³²⁾. These properties make HA suitable for incorporating novel delivery systems and providing a platform for synergistic cancer treatment. HA-based delivery systems are selectively targeted to diseased cancerous cells based on the enhanced permeability and retention (EPR) effect and the reactions between HA and HA receptors, namely RHAMM, LYVE-1, and CD44. Moreover, a negative surface charge on the HA-based delivery system allows its escape from the reticuloendothelial system (RES), improving the delivery of drugs in the diseased cancerous site⁽³³⁾. For these reasons, HA-based drug delivery systems have been extensively explored. The HA-based delivery system for cancer treatment includes micelles, liposomes, hydrogel, polymersomes, and nanoparticles and are presented in Fig 6.

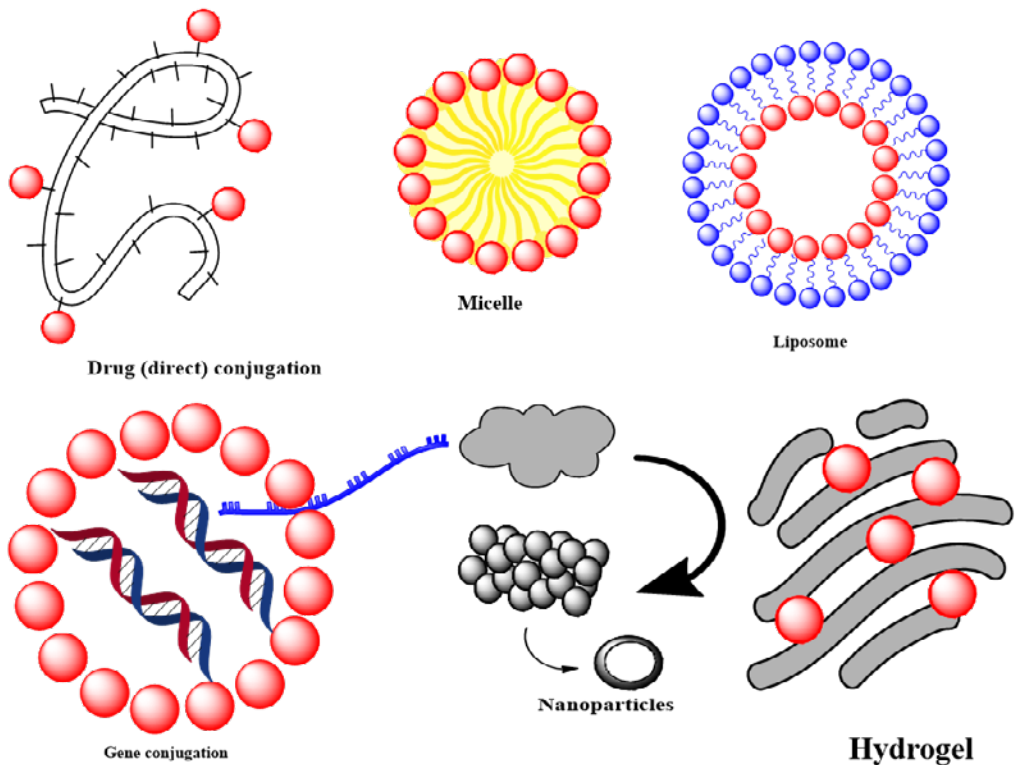


Fig 6- HA-based NDDS

HA and its derivatives as carriers

HA and its chemically modified analogs can attach to specific receptors on the cell surface in various tissues, including the lymphatic arteries, kidneys, liver, and most cancerous tissues. The unique inter-

action of these systems with their specific receptors might be used to deliver drugs to locations and can be used as a system for targeted delivery of drug molecules. HA and other systems derived from chemical alteration in the HA have been widely used as vehicles or conveyors for specific delivery of giant biomolecules such as nucleic acids, proteins, peptides, and numerous drugs with large complex structures or structurally simple but having non-drug like characteristics.

For sustained-release therapy, HA can be utilized as a medication carrier. However, its poor steadiness is a negative factor in its utilization for gene vector delivery. In that case, it becomes essential to chemically alter HA to bring such changes that can further increase its steadiness or stability. HA is quickly destroyed in the human body by an enzyme called hyaluronidase. This degradation can be avoided by adding some foreign material to it. Compound, having a nitroxide-moiety preserve hyaluronic acid from degradation. An inhibitor of hyaluronidase also prevents hyaluronic acid breakdown by decreasing the activity.

Incorporating foreign material to protect HA-based systems against degradation allows us to utilize its drug carrier system in cancer treatment therapy. The HA receptor CD44 is now reported to be over-expressed in numerous tumor cells and expressed significantly less on the outer surface of the cell membrane of neuronal cells, hematopoietic cells, and epithelial cells. The drug chemical moiety is covalently joined or connected to the carrier because of the carrier's specific drug delivery mechanism. The medication is delivered to the desired diseased neoplastic cells, tissues, or organs via the carrier's characteristic of specific and targeted recognition phenomenon inside the human beings.

Drug distribution into the body is dependent and characterized by the carrier's specific properties. At the moment, tumor-targeted treatment has used chiefly the EPR principle. The most widely used mode of active targeting includes the specific interaction between the carrier system and one of the biological components inside the body mainly located nearby or into the desired targeted site in colossal amount compared to its distribution or occurrence in other locations in the body. These biological components may be the specific sequence of polypeptides, antibodies, or the receptors' protein molecules. HA can specifically interact and combine with receptors and protein molecules and therefore plays a vital role in various biological processes, such as angiogenesis, regulation of cell division processes, repairing damaged or injured tissues, and formation of human tissues. HA and its chemically altered modified derivatives as drug delivery or conveyor system for the effective treatment of various diseases via several medicaments such as anesthetics, anti-inflammatory, and antitumors.

A specific example of HA-based drug delivery is 5-fluorouracil (5-FU). The 5-FU is a first choice or line drug to prevent and mitigate various cancers, including breast, neck, head, and colorectal. 5-FU has high toxicity for skin, GIT, heart, nervous system, and blood and blood-forming components; toxicity in skin includes mainly sensitization and dermatological reactions. 5-FU is a fluoropyrimidine that is still widely considered the gold standard for various malignancies, from various types of cancer to immunological diseases. Due to its high toxic effects on various organs, targeted delivery is needed to limit its distribution in the body to a specific desired diseased area. 5-FU-loaded HA composite microparticles have a favorable drug release profile, making them a potential delivery method for the controlled release of chemotherapeutic medicines in cancer treatment.

HA-based micelles for treatment of cancer

The concept of drug delivery by micelles formation has the drawback of balance between hydrophilicity and lipophilicity of drug molecule, concentrated but lesser amount of drug-carrying capacity, low stability and unrequired predestination release of the drug, etc. These problems give rise to a new and more advanced drug delivery system: the prodrug micelles system. Some studies show that the micellar prodrugs can be effectively used to develop such a system based on HA for the treatment of the various types of neoplasms and malignancies⁽³⁴⁾.

Micelles are colloidal dispersions composed of amphiphilic moieties ranging from 20–100nm. Self-assembled polymeric micelles are conjugated with HA to form an amphiphilic nanocarrier. The hydrophobic core of the HA-based micelles allows encapsulation of hydrophobic drugs by chemical, physical and electrostatic interactions. In contrast, the hydrophilic surface allows increased system circulation

to accumulate in cancer cells via the EPR effect. Also, coating HA with positively charged nanocarrier offers enhanced antitumor activity^(34,35).

- As for almost 90% of drugs, the principal transfer route for the doxorubicin is passive diffusion from the lipid bilayered cell membrane and nuclear membrane, and it is concentrated within the cell nucleus and causes cells to undergo apoptosis⁽³⁶⁾. Lammers et al. (2009) found that doxorubicin (DOX) prodrug micelles based on poly (ethylene glycol)-b-poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide-lactate) and DOX-MA (DOX methacrylamide) showed more pronounced effect for the cancer cells progression and spreading. Drug targeting from these micelles also showed a higher survival rate of neoplastic cells in B16F10 melanoma (mice model). The DOX micelles were more therapeutically effective in the cancer model (B16F10 melanoma) than the drug solution. It was also found that the subjects' encounters with the DOX micelles were a long time of survival compared to those who only took the DOX drug solution. One more benefit of micelles is that they show no adverse effects observed with the drug solutions at the same dose with the same route.⁽³⁷⁾
- Yin and his group (2015) prepared micelles of conjugated HA- Paclitaxel (PTX), having a disulfide bond (HA-ss-PTX) that can be broken down by redox reactions for the treatment of breast adenocarcinoma⁽³⁵⁾.
- Lee et al. (2009) prepared DOX-loaded HA- PLGA micelles to improve the cellular uptake of DOX in tumor sites and established its cytotoxicity in human colon cancer cells (HCT-116)⁽³⁶⁾.
- Li et al (2012) developed PTX-packed self-assembled micelles conjugated with hyaluronic acid-deoxycholic acid; these conjugates are redox-sensitive and are used to determine intracellular targetability in adenocarcinoma of human breast cells⁽³⁸⁾.
- Choi et al., (2012) prepared a micelle for the PEG-HA conjugation system that enclosed the Irinotecan (IRT) within the lipophilic cores of the micelle for the treatment of colon cancer⁽³⁹⁾.
- Qui and his associates (2014) formulated a pH-responsive-based micellar delivery system by conjugating HA with lipophilic poly(L-histidine) (PHis) to determine the targeting property of the carrier system in the breast cancer cells (MCF-7)⁽⁴⁰⁾.
- Thomas et al. (2014) prepared paclitaxel (PTX) packed self-assembling, biodegradable micelles conjugated with HA to target HA-responsive CD44 receptors for cancer treatment into an artificial cell line neck and head cancer cells (SCC7)⁽⁴¹⁾.
- Shin and his associates (2017) developed a micelles system that selectively responds to the MMP9 (matrix metalloproteinase 9). This system is comprised of OVA peptide and PEGylated HA for the murine cervical cancer cells (TC-1) model⁽⁴²⁾.
- Mao et al. (2019) prepared a prodrug micelle that selectively responds to GSH. It comprises DOX, HA, and amphiphilic ferrocenium-tetradecyl (Fe-C14) to treat prostate cancer (PC3)⁽⁴³⁾.

HA-based liposomes for cancer therapy

Liposomes are amphiphilic and made up of a phospholipid bilayer, having a diameter ranging from 50-100nm. In liposomes, the hydrophobic core aids in the entrapment of hydrophobic drugs, whereas the hydrophilic part aids in transporting hydrophilic drugs in the aqueous surroundings. Nowadays, liposomal nanoparticle-based drug delivery systems can be taken as the advances in the applicability of nanotechnologies for advancing cancer therapy. These day-by-day growing technologies have many benefits over widely prevalent conventional preparations of liposomes for cancer mitigation. The advantages are lesser toxicity, control over the time and rate of release pattern of API constituent from the preparation, increased physical stability inside the body, and biocompatibility.⁽⁴³⁾

Liposomes were also approved for drug delivery due to their longer circulation time into the blood, enhanced penetration ability, and controlled diffusion properties. However, liposomes exhibit limitations like poor in vivo stability and drug loading maintenance⁽¹⁵⁾.

- Taetz et al. (2009) developed positively charged HA – liposomes modified with dioleoyl phosphatidylethanolamine / 1,2-dioleoyl-3- trimethyl ammonium propane (DOPE/ DOTAP) for targeting anti-telomerase siRNAs into the cells positive for CD44 for the mitigation of lung cancer⁽⁴⁴⁾.

- Wojcicki et al., (2012) formulated HA-DOPE liposomes for transfecting the lung cancer cells.⁽⁴⁵⁾
- Rivkin et al. (2010) formulated liposomal preparation containing 1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3-Glycerol and 1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3- Phospho-ethanolamine, encapsulating paclitaxel (PTX) for the treatment of colon cancer (CT-26), which was further coated with HA by a covalent bond⁽⁴⁶⁾.
- Similar advantages were observed when Yang et al. (2013) prepared cationic paclitaxel phosphatidylcholine liposomes, electrostatically conjugated with HA for targeting colon cancer (HCT 116) and Melanoma (B16).⁽⁴⁷⁾
- Peer and Margalit (2004) also prepared liposomes coated with HA-containing the lipids like cholesterol, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylcholine for encapsulating mitomycin C in treating lung cancer.⁽⁴⁸⁾

HA-based hydrogel for cancer therapy

Hydrogels are hydrated 3D polymeric networks capable of absorbing 10 – 20% water. They are highly porous in structure which helps them deliver drugs in a predetermined mode that, in turn, depends upon the drug-carrying capacity within the gel matrix.

Hydrogels have recently gained so much attraction from researchers as polymeric systems for the evolution of biomaterial, owing to their sensitivity and responsiveness to various stimuli and their easily manipulated characteristics. These polymeric systems are very similar to natural soft tissues because of the similarity in their flexibility, softness, and a considerable amount of water carrying capacity. So, these gel systems can become a suitable alternate indisputably for the ECM.

Unique properties of these complicated 3D polymeric hydrogels, researchers have gained notable development in tumor diagnosis, reconstruction of tumor models, and other relative therapies⁽⁴⁶⁾.

However, the hydrogel has some demerits, including poor mechanical strength, and is prone to degradation. Hence, structural alternations like chemical modifications and covalent cross-linking were performed to conjugate HA with hydrogel for a logical and effective drug delivery system⁽¹⁵⁾.

- Bajaj et al. (2012) prepared PTX-loaded HA-hydrogel to mitigate ovarian carcinoma⁽⁴⁹⁾.
- Jhan et al. (2015) formulated HA-Dox nano-complex, later coated with Pluronic F127 to form a thermosensitive hydrogel to treat colon cancer (C26)⁽⁵⁰⁾.
- Cho and his associates (2015) developed platinum nanoparticles cross-linked with HA-coated hydrogel (PtNP/HA gel) against ovarian cancer⁽⁵¹⁾.
- Fu et al. (2015) developed dual stimuli-responsive DOX-loaded hydrogel and conjugated it with thiolate HA to treat nasopharyngeal carcinoma (CNE2)⁽⁵²⁾.
- Ueda and his associates (2016) incorporated IFN α into HA-coated hydrogel to mitigate metastatic cancer of renal cells⁽⁵³⁾.
- Shin et al. (2017) prepared HA-conjugated vaccine adjuvants comprising hydrophobic monophosphoryl lipid, QS21, and imiquimod (R837) against ovarian cancer.⁽⁵⁴⁾
- Yang G et al. (2017) developed methacrylate-linked HA hydrogel loaded with DOX to mitigate liver cancer, facilitating enhanced targeting of the anticancer agents at the tumor site⁽⁵⁵⁾.

HA-based nanoparticles for cancer treatment

Nanoparticles (NPs) like gold NPs (AuNP), silica-based NPs (SiNPs), magnetic NPs, quantum dots, ceramic NPs, and carbon-based NPs, are widely used for cancer treatment. However, nanoparticles exhibit certain drawbacks like less specificity and increased cytotoxicity. Thus, the surface of the NPs was modified with biopolymers for functionalization, resulting in the emergence of cancer theragnostic. Hence, surface modification of NPs with HA provides a system with much biocompatibility and specific cell targeting ability⁽¹⁵⁾.

- Li et al. (2017) synthesized HA-coated mesoporous silica NPs (MSN NPs), loaded with PTX for targeting MCF-7 breast cancer cells⁽⁵⁶⁾.
- Fu et al. (2017) synthesized HA-DOX NPs, which showed an enhanced water solubility profile of DOX and increased accumulation in liver cancer cells (HepG2)⁽⁵⁷⁾.
- Lee et al. (2014) prepared calcium phosphate NPs (CAP-NPs) and conjugated them with DOPA and HA to efficiently deliver siRNA to the solid tumor site⁽⁵⁸⁾.
- Wang et al. (2014) synthesized HA conjugated quantum dots (HA-QD) that function as CD44+ over-expressed tumor cell-targeted imaging probes. The synthesized HA- QDs exhibited improved fluorescence stability in biological fluids, which help target CD44+ breast cancer cells without causing cellular cytotoxicity⁽⁵⁹⁾.
- Yang et al. (2017) also prepared QDs, coated with magnetic Prussian blue conjugates and HA (HA-PB-QD), functioning as cancer cell theranostics. It was observed that HA-PB-QD was significantly taken up by the CD44+ cervical carcinoma cells (HeLa cells) due to the coexistence of HA and magnetic natured PB⁽⁶⁰⁾.
- Yun et al. (2004) prepared HA-cross-linked NP encapsulating β -gal plasmid to deliver DNA in cancer therapy⁽⁶¹⁾.
- Liu et al. (2015) synthesized 5 FU-loaded HA-SiNPs to increase the therapeutic activity of 5-FU in colon cancer cells. HA-SiNPs provided sustained release of 5 FU and inhibited its rapid clearance. The clearance was delayed because of the surface modification on the NP's surface, which involved an EDC reaction between the amine group of SiNPs and the carboxylic group of HA, which further facilitated an enhanced cellular uptake SiNPs by the cancer cells⁽⁶²⁾.
- Cho et al. (2011) prepared DOX-loaded ceramide-HA (HA-CE) conjugated NPs for targeted delivery in breast cancer cells (U87-MG and MCF-7). They developed similar DOX-loaded HA-CE NPs, to treat CD44+ squamous cell carcinoma (SCC7)⁽⁶³⁾.
- Wang et al., (2016) developed PTX-loaded HA-NLCs for improved therapeutic activity against ovarian cancer⁽⁶⁴⁾.

Gene Conjugation

Genetic material can be delivered from 2 different modes using non-viral and viral vectors. Non-viral vectors have a lower capacity and efficiency of transfection (gene). Adeno-associated viruses, lentiviruses, and retroviruses are examples of viral vectors and are more effective for inserting a new gene into a host. Despite the high capacity and efficiency, the viral vectors are not commonly used because they infect the host and cause toxic and immunological responses that are undesirable or, in some cases, not tolerable. These limitations avoid using viral vectors and turn the choice toward the non-viral vectors. Non-viral vectors also provide the advantages of conjugation for targeted delivery and have the capacity to load a high amount of genes per unit vector⁽⁶⁵⁾.

Oligonucleotides surface coated NPs have recently gained attraction for their usefulness in gene therapy. These Oligonucleotides surface coated NPs structures exhibit high cell uptake and more effective gene transfection without utilizing other transfection agents⁽⁶⁵⁾.

Above all, these Oligonucleotides surface coated NPs exhibit enormously efficient gene-regulating abilities, lesser toxicity, least immune responses, and resistance to destruction by the enzyme nuclease⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾.

Oligonucleotides surface-coated NPs may be applicable for gene therapy and gene delivery.

- Park et al., 2013- HA-siRNA/LPEI complex was prepared in the hope of its applicability in gene silencing; they conjugated siRNA to HA (polyanionic and flexible). Finally, the targeted systemic introduction of the HA-siApoB/LPEI system effectively down-regulated ApoB mRNA levels in the liver carcinoma. The targeted specific HA-siRNA complex system may potentially be applicable in mitigating liver cancers and other malignancies⁽⁶⁹⁾.

• Yin et al. (2015) suggested that ‘Cyclodextrins have mainly been explored to enhance membrane permeability, improve bioavailability, and mitigate the toxic effects of substances. Activation of CD44 increased its downstream processes, leading to cancer cell proliferation, metastasis and progression. Due to the selective interaction between CD44 receptors and HA can be used in cancer treatment (CD44 positive). This system is based on HA-conjugated β -CD-OEI-HA polymer β -CD star polymer with multiple oligoethylenimine (OEI) arms). This polymer showed non-toxicity and has more capacity to incorporate pDNA and selectivity for efficiently introducing a gene in CD44-positive cancer cell lines (MDA-MB-231 breast cancer cells). Finally, the increased survival of cancerous cells and effective cell division mitigation demonstrates its high potential for gene delivery in various malignancies, including cancers that are CD44 positive⁽⁷⁰⁾.

The various HA-based drug deliveries developed in the last decade to improve target ability and increase the therapeutic activity of various anticancer drugs in cancer therapy have been summarized in Table 1.

Table 1: The various HA-based drug delivery systems developed in the last decade

S. No.	Cancer	Therapeutic candidate	Observations	Refs.
HA-based Drug (direct) conjugation				
1	Human colon cancer	Paclitaxel-HA	Significantly fewer toxic effects, Provide more excellent selectivity	(71)
2	Human breast cell carcinoma	Doxorubicin-HA	The high anticancer effect, less cardiac toxicity, Greater inhibition effect, long-lasting release	(72)
3	Murine cervical cell carcinoma	HA-ovalbumin	Fewer side effects, targeted delivery, less toxicity	(73)
4	Mammary carcinoma	R848 (Immuno), HA-doxorubicin (chemo)	The high anticancer effect, less cardiac toxicity, Greater inhibition effect, long-lasting release	(74)
HA based micelles				
5	Squamous cell cancer	5B-cholanic acid-HA, paclitaxel	Increased accumulation, Effective intracellular uptake, High drug-carrying capacity for lipophilic drug	(40)
6	Breast cancer	Deoxycholic acid-HA, paclitaxel	Low systemic toxicity, Increased accumulation, Effective intracellular uptake, High drug-carrying capacity for lipophilic drug	(38)
7	Human colorectal cancer	5B-cholanic acid-HA-PEG, irinotecan	Effective intracellular uptake, High drug-carrying capacity for lipophilic drugs, Greater inhibition effect, long-lasting release	(39)
8	Murine cervical cell carcinoma	PEG-pep-HA, ovalbumin	Increased accumulation, Effective intracellular uptake, High drug-carrying capacity for lipophilic drugs, very fewer toxic effects, Provide more excellent selectivity	(42)
9	Human lung cell cancer	Hypocrellin B (PDT), paclitaxel (chemo), HA-ceramide	Effective intracellular uptake, High drug-carrying capacity for lipophilic drugs, Greater inhibition effect, long-lasting release	(75)
10	Breast adenocarcinoma	Paclitaxel (PTX)	Micelles provided burst release of PTX at the tumor site, followed by enhanced cytotoxicity and apoptosis.	(35)

S. No.	Cancer	Therapeutic candidate	Observations	Refs.
11	Colon cancer	Doxorubicin (DOX)	DOX-HA-PLGA micelles showed enhanced cellular uptake via receptor-mediated endocytosis and increased cytotoxicity with IC ₅₀ of 0.67 μg/mL, as compared to free DOX (IC ₅₀ =3.48 μg/mL)	(36)
12	Breast adenocarcinoma	PTX	The HA-based micelle showed rapid release of PTX from the system. Also, the HA micelles showed enhanced cellular uptake along with increased cytotoxicity (IC ₅₀ = 25.6 ng/mL), as compared to free PTX (IC ₅₀ = 51.7 ng/mL)	(38)
13	Colon Cancer	Irinotecan (IRT)	HA-based micelle showed enhanced tumor targeting with reduced systemic side effects.	(39)
14	Breast cancer	DOX	Micelle provided pH-dependent DOX release, followed by rapid cellular uptake via CD44+ receptor-mediated endocytosis.	(40)
15	Head and neck cancer	PTX	PTX-HA micelles showed enhanced cellular uptake and cytotoxicity for the 1-100 μg/mL concentration.	(41)
16	Breast cancer	PTX	Micelle showed high drug loading capacity, lysosomal pH mediated rapid release of PTX, and efficient cytotoxicity compared to free PTX.	(76)
17	Cervical cancer	Ovalbumin (OVA)	The micellar system showed enhanced cellular uptake, accompanied by apoptosis.	(42)
18	Prostate cancer	DOX	The micellar system showed rapid dissociation of micelles, resulting in rapid release of DOX, followed by enhanced Cytotoxicity, as compared to free DOX.	(43)
HA based polymersome				
19	human breast cell cancer	DSPE-PEG-HA, doxorubicin	More selective, High anticancer efficacy, the pH-dependent release of drug	(77)
20	human lung small cell cancer	DSPE-PEG-HA, pDNA	Longer retention, the pH-dependent release of drug	(78)
21	Melanoma	DSPE-PEG-HA, siRNA (for TGF-β)	High drug-carrying capacity for lipophilic drug, Greater inhibition effect, long-lasting release, more selective, High anticancer efficacy, the pH-dependent release of drug	(79)
22	mammary cell cancer	Marimastat (TME), HA-paclitaxel (chemo)	More selective, High anticancer efficacy, the pH-dependent release of drug	(80)
HA Based Hydrogel complex				
23	human ovarian cell carcinoma	paclitaxel	Longer retention, highly viscous, high and longer localized concentration of the drug, suitable for chronic treatment	(49)
24	human renal cell cancer	HA-tyramine, IFN-α, sorafenib	Orally, the long-acting, large amount of drug can be loaded, Longer retention, the highly viscous, high, and longer localized concentration of the drug, suitable for chronic treatment	(53)

S. No.	Cancer	Therapeutic candidate	Observations	Refs.
25	Lymphocyte cell cancer	Monophosphoryl lipid, QS21, R837 + HA	Low systemic toxicity, Increased accumulation, Effective intracellular uptake, High drug-carrying capacity for lipophilic drug, Longer retention, the highly viscous, high and longer localized concentration of the drug, suitable for chronic treatment	(54)
26	human breast cell carcinoma	Doxorubicin (chemo), mRNA (gene), HA-chitosan	Longer retention, highly viscous, high and longer localized concentration of the drug, suitable for chronic treatment	(81)
27	human lung cell cancer	Graphene (PTT), doxorubicin (chemo), HA-disulfide	Longer retention, highly viscous, high and longer localized concentration of the drug, suitable for chronic treatment	(82)
28	Ovarian cancer	PTX	PTX-HA-hydrogel showed enhanced retention in the intraperitoneal cavity, resulting in increased accumulation of PTX at tumor site, followed by reduced tumor volume.	(47)
29	Colon cancer	DOX	HA-coated hydrogel significantly inhibited tumor growth, and the presence of HA facilitated lymphatic uptake.	(28)
30	Ovarian cancer	Platinum (Pt)	PtNP/HA gel showed prolonged retention in the peritoneal cavity, where PtNP was released slowly and was selectively targeted to CD44+ cancer cells.	(51)
31	Nasopharyngeal carcinoma	DOX	HA-DOX hydrogel offered sustain release profile of DOX. The hydrogel also showed significant tumor growth inhibition compared to free DOX.	(50)
32	Renal cell carcinoma	Interferon- α (IFN- α)	HA-hydrogel significantly inhibited tumor growth, as well as suppressed tumor proliferation, resulting in apoptosis, and anti-angiogenesis.	(53)
33	Ovarian cancer	Imiquimod (R837)	HA-Hydrogel effectively suppressed the tumor proliferation, resulting in apoptosis.	(52)
34	Liver cancer	DOX	DOX-loaded HA hydrogel facilitated enhanced targeting at the tumor site via CD44+ receptor-mediated endocytosis, with reduced systemic toxicity.	(57)
HA Based Nanoparticles				
35	human breast carcinoma	Gold nanoparticle (PTT), doxorubicin (chemo), HA-dopamine	Decreased toxicity, increased water solubility, prolonged release, increased acceptability	(83)
36	Breast cancer	PTX	HA-PTX-loaded MSN NPs showed enhanced accumulation via receptor-mediated endocytosis, followed by enhanced tumor cell suppression and limited toxicity compared to free PTX.	(56)
37	Liver cancer	DOX	HA-DOX NPs showed increased water solubility and increased tumor cell accumulation. The release of DOX from NPs was pH-dependent.	(57)
38	Solid tumors	siRNA	HA-NPs protect the siRNA from enzymatic degradation, facilitating siRNA targeting at the solid tumor site.	(58)

S. No.	Cancer	Therapeutic candidate	Observations	Refs.
39	Breast cancer	Quantum dots (QD)	HA-QD was used as an imaging probe to help target the CD44+ breast cancer cells without causing systemic toxicity.	(59)
40	Cervical carcinoma	Prussian blue (PB) – QD	HA-PB-QD functions as cancer cell theranostic. They are significantly taken by CD44+ cancer cells, showing an 89.95% reduction in tumor volume.	(60)
41	Cancer	β -gal plasmid	HA-NP showed controlled release of DNA in the tumor sites with fast transfection (60 days).	(61)
42	Colon cancer	5-Fluorouracil (5-FU)	HA-5FU-SiNPs showed sustained release of 5 FU accompanied by delayed renal clearance.	(62)
43	Breast cancer	DOX	HA-CE-DOX-NPs showed enhanced cellular uptake, and increased cytotoxicity (IC50 = 200.94 ng/mL), as compared to free DOX (IC50 = 966.43 ng/mL).	(63)
44	Squamous cell carcinoma	DOX	NPs showed enhanced receptor-mediated cellular uptake, improved cytotoxicity profile, and reduced tumor volume (19%) as compared to free DOX (48.7%).	(64)
45	Ovarian cancer	PTX	HA-PTX-NLC showed efficient inhibition of cell viability <i>in vivo</i> and reduced tumor volume compared to free PTX.	(65)
HA Based Nanoparticle (surface modification)				
47	Human breast cell cancer	Si nanoparticle, paclitaxel	Strongly oppose cancer, few toxic and side effects, High anticancer effect, more uptake in the tissues, more selective	(56)
48	Liver cell cancer	SPION-HA, doxorubicin	Specific and selective accumulation, Biologically recognizable, High solubility in the water	(57)
49	Colorectal cancer	Calcium phosphate-HA, siRNA	Strongly oppose cancer, few toxic and side effects, High anticancer effect, more uptake in the tissues, more selective	(58)
HA based Complex (electric interaction)				
50	WBC cell subtype CDD4 cell cancer	Polyethyleneimine-HA, siRNA	Uptake via Receptor More inhibition potential	(84)
51	Kidney cell cancer, melanoma	Polyethyleneimine-HA, siRNA	More uptake, more inhibition, receptor-mediated recognition, specific for the target	(85)
HA based Gene conjugation				
52	HCT-116 (human colon cancer)	siRNA-HA	Less systemic availability, more uptake, more inhibition, receptor-mediated recognition, specific for the target	(86)
HA based Liposomal drug delivery system				
53	Lung cancer	siRNA	HA-based liposomes showed enhanced targeting via CD44+ receptor-mediated endocytosis. Further, the presence of HA protected siRNA from RNaseV1.	(44)
54	Lung cancer	DNA	HA-DOPE liposomes showed significantly enhanced transfection as compared to Lipofectamine.	(78)

S. No.	Cancer	Therapeutic candidate	Observations	Refs.
55	Colon cancer	PTX	HA-liposomes showed increased accumulation of PTX at the tumor site with less distribution in the spleen and liver. Also, HA-liposomes showed reduced tumor volumes compared to free PTX.	(39)
56	Colon cancer and melanoma	PTX	HA-liposomes showed increased antitumor activity and reduced tumor volume compared to free PTX and non-coated liposomes.	(62)
57	Lung cancer	Mitomycin C	HA-coated liposomes showed enhanced drug efficacy, increased accumulation of mitomycin C at the tumor site, and reduced tumor volume with no systemic side effects.	(48)

Conclusion

The developments in nanotechnology paved a new and promising way in cancer, including prevention and therapeutics. Most instantly, HA is employed as a carrier for antineoplastic drugs due to its targeting ability and susceptibility to degrade via hyaluronidase enzyme inside the body. The research concluded that targeting cancer cells responds to overexpression of HA receptors, majorly CD44. Similarly, HA-based nanoparticles actively target and enter the cancer cells via CD44+ receptor-mediated endocytosis. The researchers developed various HA-based nanocarriers; the most prominent are micelles, liposomes, hydrogels, nanoparticles, and others. These HA-based nanocarriers can effectively deliver the anticancer drugs at the tumor site via passive targeting (by EPR) or active targeting (via receptor-mediated phenomena). These HA-based nanocarriers provide advantages over other delivery systems, including higher biocompatibility, prolonged circulation time, enhanced cellular uptake, and improved stability. They have significant PDT, PTT, MRI, and fluorescence imaging applications in the theragnostic field. Expectations towards elaborative strategies in biomedical applications of HA for the efficient treatment of cancer in the future are high.

Acknowledgment

Authors acknowledge the Principal Faculty of Pharmacy, VNS Group of Institutions, for providing valuable time to review the manuscript.

References

- Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):62-8. DOI:10.1126/science.aaa4967
- Nie F, Yu X, Huang M, Wang Y, Xie M, Ma H, et al. Long noncoding RNA ZFAS1 promotes gastric cancer cells proliferation by epigenetically repressing KLF2 and NKD2 expression. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(24):38227. DOI: 10.18632/oncotarget.9611
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. DOI:10.1002/ijc.25516
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A cancer journal for clinicians*. 2012 Jul;62(4):220-41. DOI:10.3322/caac.21149
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: A cancer journal for clinicians*. 2010 Sep;60(5):277-300. DOI:10.3322/caac.20073

6. McGuire S. World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015. *Advances in nutrition*. 2016 Mar;7(2):418-9. DOI: <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>
7. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*. 2011 Aug 12;3(3):3279-330. DOI:10.3390/cancers3033279
8. Kayl AE, Meyers CA. Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. *Current opinion in obstetrics and gynecology*. 2006 Feb 1;18(1):24-8. DOI: 10.1097/01.gco.0000192996.20040.24
9. Shah K, Crowder D, Overmeyer J, Maltese W, Yun Y. Hyaluronan drug delivery systems are promising for cancer therapy because of their selective attachment, enhanced uptake, and superior efficacy. *Biomedical Engineering Letters*. 2015 Jun;5(2):109-23.
10. Luo Z, Dai Y, Gao HJAPSB. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B*. 2019 Nov 1;9(6):1099-112. DOI:10.1016/j.apsb.2019.06.004
11. Huang G, Huang H. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *J. Controlled Release*. 2018 May 28; 278:122-6. DOI:10.1016/j.jconrel.2018.04.015
12. Robert L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. *Pathol. Biol*. 2015 Feb 1;63(1):32-4. DOI:10.1016/j.patbio.2014.05.019
13. Reed RK, Lilja K, Laurent TC. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol. Scand*. 1988 Nov;134(3):405-11. DOI:10.1111/j.1748-1716.1988.tb08508.x
14. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):237-46.
15. Lee SY, Kang MS, Jeong WY, Han DW, Kim KS. Hyaluronic acid-based theranostic nanomedicines for targeted cancer therapy. *Cancers* 2020 Apr 10;12(4):940. DOI:10.3390/cancers12040940
16. Ossipov DA. Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opin. Drug Delivery*. 2010 Jun 1;7(6):681-703. DOI:10.1517/17425241003730399
17. Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug delivery*. 2018 Jan 1;25(1):766-72. DOI:10.1080/10717544.2018.1450910
18. Meyer K, Palmer JW. On the nature of the ocular fluids. *Am. J. Ophthalmol*. 1936 Oct 1;19(10):859-65. DOI:10.1016/S0002-9394(36)92723-X
19. Kogan G, Šoltés L, Stern R, Schiller J, Mendichi R. Hyaluronic acid: its function and degradation in vivo systems. *Studies in natural products chemistry*. 34: Elsevier; 2008 Jan 1;34:789-882. DOI:10.1016/S1572-5995(08)80035-X
20. Ito Y. Growth Factors and Protein-Modified Surfaces and Interfaces. In *Comprehensive Biomaterials*, Ducheyne P (Ed), 4.416: Elsevier; 2011,247-279. DOI:10.1016/B978-0-08-055294-1.00263-4.
21. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*. 2018;10(7):701. DOI:10.3390/polym1007070
22. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R, Uspenskaya M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physicochemical, and degradable properties of biopolymer. *Polymers*.2020;12(8):1800. DOI:10.3390/polym12081800
23. Ignatova EY, Gurov AJPCJ. Principles of extraction and purification of hyaluronic acid. *Pharm. Chem. J*. 1990;24(3):211-216.
24. Selyanin MA, Boykov PY, Khabarov VN, Polyak FJ. Properties, Application in Biology, Medicine. The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use. In *Hyaluronic Acid*. John Wiley & Sons, Ltd; 2015:1-8. DOI:10.1002/9781118695920

25. Zhong W, Pang L, Feng H, Dong H, Wang S, Cong H, et al. Recent advantage of hyaluronic acid for anticancer application: a review of “3S” transition approach. *Carbohydr. Polym.* 2020; 238:116204. DOI:10.1016/j.carbpol.2020.116204
26. Liu E, Zhou Y, Liu Z, Li J, Zhang D, Chen J, et al. Cisplatin loaded hyaluronic acid modified TiO₂ nanoparticles for neoadjuvant chemotherapy of ovarian cancer. *J. Nanomater.* 2015; DOI:10.1155/2015/390358.
27. Xin D, Wang Y, Xiang J. The use of amino acid linkers in the conjugation of paclitaxel with hyaluronic acid as drug delivery system: synthesis, self-assembled property, drug release, and in vitro efficiency. *Pharm. Res.* 2010;27(2):380-389.
28. El Kechai N, Bochet A, Huang N, Nguyen Y, Ferrary E, Agnely F. Effect of liposomes on rheological and syringe ability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs. *International journal of pharmaceutics.* 2015; 487(1-2):187-196. DOI:10.1016/j.ijpharm.2015.04.019
29. Park JK, Shim JH, Kang KS, Yeom J, Jung HS, Kim JY, et al. Solid free-form fabrication of tissue-engineering scaffolds with a poly (lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid conjugate encapsulating an intact bone morphogenetic protein-2/poly (ethylene glycol) complex. *Adv. Funct. Mater.* 2011;21(15):2906-2912. DOI:10.1002/adfm.201100612
30. Chen ZX, Liu MD, Zhang MK, Wang SB, Xu L, Li CX, et al. Interfering with Lactate-Fueled Respiration for Enhanced Photodynamic Tumor Therapy by a Porphyrinic MOF Nanoplatform. *Adv. Funct. Mater.* 2018;28(36):1803498. DOI:10.1002/adfm.201803498
31. Gotov O, Battogtokh G, Ko Y. Docetaxel-loaded hyaluronic acid–cathepsin b-cleavable-peptide–gold nanoparticles for the treatment of cancer. *Mol. Pharmaceutics.* 2018;15(10):4668-4676. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b0064
32. Yadav AK, Mishra P, Jain S, Mishra P, Mishra AK, Agrawal G. Preparation and characterization of HA–PEG–PCL intelligent core–corona nanoparticles for delivery of doxorubicin. *J. Drug Targeting.* 2008;6(6):464-478. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.01.021
33. Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials.* 2011; 32(13):3435-3446. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.01.021
34. Kim K, Choi H, Choi ES, Park M-H, Ryu J-HJP. Hyaluronic acid-coated nanomedicine for targeted cancer therapy. *Pharmaceutics.* 2019;11(7):301. DOI:10.3390/pharmaceutics11070301
35. Yin T, Wang J, Yin L, Shen L, Zhou J, Huo MJPC. Redox-sensitive hyaluronic acid–paclitaxel conjugate micelles with high physical drug loading for efficient tumor therapy. *Polym. Chem.* 2015;6(46):8047-8059.
36. Lee H, Ahn CH, Park TG. Poly [lactic-co-(glycolic acid)]-grafted hyaluronic acid copolymer micelle nanoparticles for target-specific delivery of doxorubicin. *Macromol. Biosci.* 2009; 9(4):336-342. DOI:10.1002/mabi.200800229
37. Lammers T, Subr V, Ulbrich K, Peschke P, Huber PE, Hennink WE, Storm G. Simultaneous delivery of doxorubicin and gemcitabine to tumors in vivo using prototypic polymeric drug carriers. *Biomaterials.* 2009 Jul 1;30(20):3466-75.
38. Li J, Huo M, Wang J, Zhou J, Mohammad JM, Zhang Y, et al. Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials.* 2012; 33(7):2310-2320. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.11.022
39. Choi KY, Jeon EJ, Yoon HY, Lee BS, Na JH, Min KH, et al. Theragnostic nanoparticles based on PEGylated hyaluronic acid for the diagnosis, therapy and monitoring of colon cancer. *Biomaterials.* 2012;33(26):6186-6193. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.05.029
40. Qiu L, Li Z, Qiao M, Long M, Wang M, Zhang X, et al. Self-assembled pH-responsive hyaluronic acid–g-poly (l-histidine) copolymer micelles for targeted intracellular delivery of doxorubicin. *Acta Biomater.* 2014;10(5):2024-2035. DOI:10.1016/j.actbio.2013.12.025

41. Thomas RG, Moon M, Lee S, Jeong Y. Paclitaxel loaded hyaluronic acid nanoparticles for targeted cancer therapy: in vitro and in vivo analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;; 72:510-518. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.054
42. Shin JM, Oh SJ, Kwon S, Deepagan V, Lee M, Song SH, et al. A PEGylated hyaluronic acid conjugate for targeted cancer immunotherapy. *J. Controlled Release.* 2017; 267:181-190. DOI:10.1016/j.jconrel.2017.08.032
43. Mao H-L, Qian F, Li S, Shen J-W, Ye C-K, Hua L, et al. delivery of doxorubicin from hyaluronic acid-modified glutathione-responsive ferrocene micelles for combination cancer therapy. *Mol. Pharmaceutics.* 2019 Jan 9;16(3):987-994. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00862
44. Taetz S, Bochot A, Surace C, Arpicco S, Renoir J-M, Schaefer UF, et al. Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells. *Oligonucleotides.* 2009;;19(2):103-116. DOI:10.1089/oli.2008.0168
45. Wojcicki AD, Hillaireau H, Nascimento TL, Arpicco S, Taverna M, Ribes S, et al. Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor. *J. Controlled Release.* 2012; ,162(3):545-552. DOI:10.1016/j.jconrel.2012.07.015
46. Rivkin I, Cohen K, Koffler J, Melikhov D, Peer D, Margalit RJB. Paclitaxel-clusters coated with hyaluronan as selective tumor-targeted nanovectors. *Biomaterials.* 2010; 31(27):7106-7114. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.05.067
47. Yang X-y, Li Y-x, Li M, Zhang L, Feng L-x, Zhang NJCl. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. *Cancer letters.* 2013;; 334(2):338-345. DOI:10.1016/j.canlet.2012.07.002
48. Peer D, Margalit RJIJoC. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models. *Int. J. Cancer.* 2004; 108(5):780-789. DOI:10.1002/ijc.11615
49. Bajaj G, Kim MR, Mohammed SI, Yeo YJJoCR. Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors. *J. Controlled Release.* 2012;;158(3):386-392. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.12.001
50. Jhan H-J, Liu J-J, Chen Y-C, Liu D-Z, Sheu M-T, Ho H-OJN. Novel injectable thermosensitive hydrogels for delivering hyaluronic acid–doxorubicin nanocomplexes to locally treat tumors. *Nanomedicine.* 2015;10(8):1263-1274. DOI:10.2217/nnm.14.211
51. Cho EJ, Sun B, Doh K-O, Wilson EM, Torregrosa-Allen S, Elzey BD, et al. Intraperitoneal delivery of platinum with in-situ crosslinkable hyaluronic acid gel for local therapy of ovarian cancer. *Biomaterials.* 2015;37:312-319. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.10.039
52. Fu C, Li H, Li N, Miao X, Xie M, Du W, et al. Conjugating an anticancer drug onto thiolated hyaluronic acid by acid liable hydrazone linkage for its gelation and dual stimuli-response release. *Carbohydr. Polym.* 2015; , 128:163-170. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.04.024
53. Ueda K, Akiba J, Ogasawara S, Todoroki K, Nakayama M, Sumi A, et al. Growth inhibitory effect of an injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogels incorporating human natural interferon- α and sorafenib on renal cell carcinoma cells. *Acta Biomater.* 2016;;29:103-111. DOI:10.1016/j.actbio.2015.10.024
54. Shin WJ, Noh HJ, Noh Y-W, Kim S, Um SH, Lim Y. Hyaluronic acid-supported combination of water insoluble immunostimulatory compounds for anticancer immunotherapy. *Carbohydr. Polym.* 2017;; 155:1-10. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.08.040
55. Yang G, Fu S, Yao W, Wang X, Zha Q, Tang R, et al. Hyaluronic acid nanogels prepared via ortho ester linkages show pH-triggered behavior, enhanced penetration and antitumor efficacy in 3-D tumor spheroids. *J. Colloid Interface Sci.* 2017;; 504:25-38. DOI:10.1016/j.jcis.2017.05.033
56. Li J, Yang X, Yang P, Gao F, Chemistry N-M. Hyaluronic acid–conjugated silica nanoparticles for breast cancer therapy. *Inorg. Nano-Met. Chem.* 2017;47(5):777-782. DOI:10.1080/15533174.2016.1218509

57. Fu C, Yang R-M, Wang L, Li N-n, Qi M, Xu X-d, et al. Surface functionalization of superparamagnetic nanoparticles by an acid-labile polysaccharide-based prodrug for combinatorial monitoring and chemotherapy of hepatocellular carcinoma. *RSC Adv.* 2017;7(66):41919-41928.
58. Lee MS, Lee JE, Byun E, Kim NW, Lee K, Lee H, et al. Target-specific delivery of siRNA by stabilized calcium phosphate nanoparticles using dopa-hyaluronic acid conjugate. *J. Controlled Release.* 2014;92:122-130. DOI:10.1016/j.jconrel.2014.06.049
59. Wang H, Sun H, Wei H, Xi P, Nie S, Ren Q. Biocompatible hyaluronic acid polymer-coated quantum dots for CD44+ cancer cell-targeted imaging. *J. Nanopart. Res.* 2014;16(10):1-13.
60. Yang Y, Jing L, Li X, Lin L, Yue X, Dai Z. Hyaluronic acid conjugated magnetic prussian blue@ quantum dot nanoparticles for cancer theranostics. *Theranostics.* 2017;7(2):466.
61. Yun YH, Goetz DJ, Yellen P, Chen WJB. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials.* 2004;25(1):147-157. DOI:10.1016/S0142-9612(03)00467-8
62. Liu K, Wang Z-q, Wang S-j, Liu P, Qin Y-h, Ma Y, et al. Hyaluronic acid-tagged silica nanoparticles in colon cancer therapy: therapeutic efficacy evaluation. *Int. J. Nanomed.* 2015;10:6445.
63. Cho H-J, Yoon HY, Koo H, Ko S-H, Shim J-S, Lee J-H, et al. Self-assembled nanoparticles based on hyaluronic acid-ceramide (HA-CE) and Pluronic® for tumor-targeted delivery of docetaxel. *Biomaterials.* 2011;32(29):7181-7190. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.06.028
64. Wang L, Jia E. Ovarian cancer targeted hyaluronic acid-based nanoparticle system for paclitaxel delivery to overcome drug resistance. *Cancer Drug Delivery.* 2016; 23(5):1810-1817. DOI:10.3109/10717544.2015.1101792
65. Nam J-P, Nah J-W. Target gene delivery from targeting ligand conjugated chitosan-PEI copolymer for cancer therapy. *Carbohydr. Polym.* 2016;135:153-161. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.08.053
66. Zheng D, Giljohann DA, Chen DL, Massich MD, Wang X-Q, Iordanov H, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(30):11975-11980. DOI:10.1073/pnas.1118425109
67. Massich MD, Giljohann DA, Schmucker AL, Patel PC, Mirkin CA. Cellular Response of Polyvalent Oligonucleotide-Gold Nanoparticle Conjugates. *ACS nano.* 2010; 4(10):5641-5646.
68. Massich MD, Giljohann DA, Seferos DS, Ludlow LE, Horvath CM, Mirkin CAJMp. Regulating immune response using polyvalent nucleic acid-gold nanoparticle conjugates. *Mol. Pharmaceutics.* 2009;6(6):1934-1940. DOI:10.1021/mp900172m
69. Park K, Yang J-A, Lee M-Y, Lee H, Hahn SK. Reducible hyaluronic acid-siRNA conjugate for target specific gene silencing. *Bioconjugate Chem.* 2013;24(7):1201-1209. DOI:10.1021/bc4001257
70. Yin H, Zhao F, Zhang D, Li JJ. Hyaluronic acid conjugated β -cyclodextrin-oligoethylenimine star polymer for CD44-targeted gene delivery. *Int. J. Pharm.* 2015;483(1-2):169-179. DOI:10.1016/j.ijpharm.2015.02.022
71. Lee H, Lee K, Park TG. Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: Synthesis, characterization, and antitumor activity. *Bioconjugate chemistry.* 2008;19(6):1319-1325. DOI:10.1021/bc8000485
72. Cai S, Thati S, Bagby TR, Diab H-M, Davies NM, Cohen MS, et al. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *J. Controlled Release.* 2010;146(2):212-218. DOI:10.1021/bc8000485
73. Lee Y-H, Yoon HY, Shin JM, Saravanakumar G, Noh KH, Song K-H, et al. A polymeric conjugate for foreignizing tumor cells for targeted immunotherapy in vivo. *J. Controlled Release.* 2015;199:98-105. DOI:10.1016/j.jconrel.2014.12.00
74. Liu Y, Qiao L, Zhang S, Wan G, Chen B, Zhou P, et al. Dual pH-responsive multifunctional nanoparticles for targeted treatment of breast cancer by combining immunotherapy and chemotherapy. *Acta Biomater. Acta biomaterialia.* 2018; 66:310-324. DOI:10.1016/j.actbio.2017.11.010

- 75.** Chang J-E, Cho H-J, Yi E, Kim D-D, Jheon S. Hypocrellin B and paclitaxel-encapsulated hyaluronic acid-ceramide nanoparticles for targeted photodynamic therapy in lung cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016;158:113-121. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2016.02.035
- 76.** Zhong Y, Goltsche K, Cheng L, Xie F, Meng F, Deng C, et al. Hyaluronic acid-shelled acid-activatable paclitaxel prodrug micelles effectively target and treat CD44-overexpressing human breast tumor xenografts in vivo. *Biomaterials*. 2016;84:250-261. DOI:10.1016/j.biomaterials.2016.01.049
- 77.** Paliwal SR, Paliwal R, Agrawal GP, Vyas SP. Hyaluronic acid modified pH-sensitive liposomes for targeted intracellular delivery of doxorubicin. *Journal of liposome research*. 2016;26(4):276-287. DOI:10.3109/08982104.2015.1117489
- 78.** Zhang B, Zhang Y, Yu D. Lung cancer gene therapy: Transferrin and hyaluronic acid dual ligand-decorated novel lipid carriers for targeted gene delivery. *Oncol. Rep.* 2017;37(2):937-944. DOI:10.3892/or.2016.5298
- 79.** Xu Z, Wang Y, Zhang L, Huang L. Nanoparticle-delivered transforming growth factor- β siRNA enhances vaccination against advanced melanoma by modifying tumor microenvironment. *ACS nano*. 2014;8(4):3636-3645. DOI:10.1021/nn500216y
- 80.** Lv Y, Xu C, Zhao X, Lin C, Yang X, Xin X, et al. Nanoplatform assembled from a CD44-targeted prodrug and smart liposomes for dual targeting of tumor microenvironment and cancer cells. *ACS Nano*. 2018;12(2):1519-1536. DOI:10.1021/acsnano.7b08051
- 81.** Deng X, Cao M, Zhang J, Hu K, Yin Z, Zhou Z, et al. Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. *Biomaterials*. 2014;35(14):4333-4344. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.02.006
- 82.** Khatun Z, Nurunnabi M, Nafiujjaman M, Reeck GR, Khan HA, Cho KJ, et al. A hyaluronic acid nanogel for photo-chemo theranostics of lung cancer with simultaneous light-responsive controlled release of doxorubicin. *Nanoscale*. 2015;7(24):10680-10689.
- 83.** Wang Z, Chen Z, Liu Z, Shi P, Dong K, Ju E, et al. A multi-stimuli responsive gold nanocage-hyaluronic platform for targeted photothermal and chemotherapy. *Biomaterials*. 2014;35(36):9678-88. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.08.013
- 84.** Ganesh S, Iyer AK, Morrissey DV, Amiji MM. Hyaluronic acid based self-assembling nanosystems for CD44 target mediated siRNA delivery to solid tumors. *Biomaterials*. 2013;34(13):3489-3502. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.01.077
- 85.** Jiang G, Park K, Kim J, Kim KS, Oh EJ, Kang H, et al. Hyaluronic acid-polyethyleneimine conjugate for target specific intracellular delivery of siRNA. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 2008;89(7):635-642. DOI:10.1002/bip.20978
- 86.** Lee H, Mok H, Lee S, Oh Y-K, Park TG. Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *J. Controlled Release*. 2007;119(2):245-252. DOI:10.1016/j.jconrel.2007.02.011