

The background of the cover is a detailed illustration of various vintage scientific apparatuses, including flasks, tubes, and a battery, rendered in a sepia tone. A large, semi-transparent reddish-brown rectangle is centered over the image, containing the title and author information.

# RETOS ACTUALES DE LA FARMACIA

LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN  
MARIANA ORTIZ REYNOSO  
HARIZ ISLAS FLORES  
JONNATHAN G. SANTILLAN BENITEZ  
ENRIQUE MORALES ÁVILA

(Coordinadores)



Universidad Autónoma  
del Estado de México



## Retos actuales de la farmacia

DIRECCIÓN DE PUBLICACIONES UNIVERSITARIAS  
*Editorial de la Universidad Autónoma del Estado de México*

*Dr. en Ed. Alfredo Barrera Baca*  
Rector

*Dr. en A. José Edgar Miranda Ortiz*  
Secretario de Difusión Cultural

*M. en A. Jorge E. Robles Alvarez*  
Director de Publicaciones Universitarias

# Retos actuales de la farmacia

LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN  
MARIANA ORTIZ REYNOSO  
HARIZ ISLAS FLORES  
JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN BENÍTEZ  
ENRIQUE MORALES ÁVILA

(Coordinadores)



Universidad Autónoma del Estado de México

*“2019, Año del 75 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM”*

Esta obra acreditó el proceso de revisión por pares bajo la modalidad doble ciego, recurriendo a dictaminadores externos a la institución editora.

Primera edición, noviembre 2019

*Retos actuales de la farmacia*

Leobardo Manuel Gómez Oliván, Mariana Ortíz Reynoso, Hariz Islas Flores,  
Jonnathan Guadalupe Santillan Benitez, Enrique Morales Ávila  
(Coordinadores)

Universidad Autónoma del Estado de México  
Av. Instituto Literario 100 Ote.  
Toluca, Estado de México

C.P. 50000

Tel: (52) 722 277 3835 y 36

<http://www.uaemex.mx>



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional. Puede ser utilizada con fines educativos, informativos o culturales, siempre que se cite la fuente. Disponible para su descarga en acceso abierto en: <http://ri.uaemex.mx/>

Citación:

Gómez Oliván, Leobardo Manuel; Ortiz Reynoso, Mariana; Islas Flores, Hariz; Santillan Benitez, Jonnathan Guadalupe; Morales Ávila, Enrique (2019). *Retos actuales de la farmacia*, México, Universidad Autónoma del Estado de México.

ISBN: 978-607-633-130-9

Hecho en México

*Made in Mexico*

## ÍNDICE

PRÓLOGO	11
Variantes genéticas que influyen en el desarrollo de úlcera de pie diabético y neuropatías en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 <i>Claudia Miriam Alonzo De la Rosa,</i> <i>Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, Miriam Verónica Flores Merino</i>	13
Polimorfismos de nucleótido único asociados con el tratamiento para carcinoma de células renales metastásico <i>Raúl Gerardo Haro Díaz, Saúl Campos Gómez,</i> <i>Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, Leobardo Manuel Gómez Oliván</i>	35
Análisis de expresión génica en líneas celulares de cáncer de mama <i>Rodolfo López Linares, Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez</i>	59
Polimorfismo del CYP1a1 Ile462Val y su relación con diversos tipos de cáncer ¿Efecto causante o protector? Una revisión <i>Esmeralda Michelle Sánchez Ocampo, Leobardo Manuel Gómez Oliván,</i> <i>Guillermo Elizondo Azuela, Mineko Shibayama Salas</i>	87
En busca del perfil genético de la preeclampsia <i>Sindy SanJuan Reyes, Leobardo Manuel Gómez Oliván,</i> <i>Jonnathan G. Santillán Benítez, Hariz Islas Flores, Octavio Dublán García</i>	119

Epigenética en cáncer: una oportunidad para la prevención,  
tratamiento y nuevas estrategias terapéuticas  
*Jesús Enrique Sánchez Flores, Enrique Morales Avila,  
Jonnathan G. Santillán Benítez, Hariz Islas Flores* 157

Ecofarmacovigilancia de hipolipemiantes (estatinas y fibratos).  
Efectos en organismos acuáticos  
*Edgar David González González, Leobardo Manuel Gómez Oliván,  
Marcela Galar Martínez, Hariz Islas Flores, María Dolores Hernández Navarro* 179

Tecnovigilancia: el nuevo enfoque del farmacéutico  
*Mayred Yeselin León García, Martha Díaz Flores,  
Mariana Ortiz Reynoso, Víctor Manuel Elizalde Valdés* 201

Conocimientos, habilidades y actitudes en farmacovigilancia entre  
profesionales de la salud y utilidad de las intervenciones educativas  
como herramienta de mejora de estos  
*Jesús Mata Maldonado, Mariana Ortiz Reynoso* 223

Ketamina, usos clínicos en humanos  
*Mario Ángel Rosas Sánchez, Ma. Victoria Domínguez García,  
Miriam V. Flores Merino* 249

Disolución intrínseca: revisión de su utilidad en la industria farmacéutica  
*Edna Teresa Alcántara Fierro, Mariana Ortiz Reynoso* 275

- Evaluación del efecto del aglutinante y la velocidad de agitación de un granulador de alto corte en las características fisicoquímicas de un granulado de valproato de magnesio  
*Diego Gorostieta Hernández, Mariana Ortiz Reynoso, Martha Díaz Flores, Liliana Schifter Aceves* 309
- Estudio comparativo del control de la liberación del valproato de magnesio en matrices hidrofílicas de HPC y HPMC  
*Wendy C. Sánchez Brito, Mariana Ortiz Reynoso* 339
- Cicloadiciones (3 + 2) azida-enolato como herramienta para la obtención de compuestos antifúngicos: síntesis de análogos nucleosídicos y del miconazol  
*Davir González Calderón, Aydeé Fuentes Benites, Carlos González Romero* 375



## PRÓLOGO

Las ciencias farmacéuticas son el área de las ciencias de la salud que estudia la procedencia, naturaleza, propiedades y técnicas de preparación de medicamentos para su correcto aprovechamiento terapéutico, así como el efecto de los medicamentos sobre el organismo. En este contexto, el papel de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) en la formación de profesionales de esta área, tiene un papel fundamental, además, este compromiso está enmarcado en los principios científicos, éticos, humanísticos, sustentables y normativos.

El programa educativo de Maestría y Doctorado en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas está consciente de dichas premisas, y con el fin de reforzar la formación de sus estudiantes, presenta el libro *Retos actuales en Farmacia*. Éste es un ejercicio formal de escritura, son revisiones actuales en el área de ciencias farmacéuticas y resultados de investigación de los temas de tesis desarrollados por los estudiantes. Además, de acuerdo con el Reglamento de los Estudios Avanzados de la UAEM, este proceso es importante para obtener el grado en la modalidad de tesis por publicación de un capítulo en un libro. Por ello, se ha garantizado la evaluación rigurosa de los contenidos, en un formato académico como el utilizado en las editoriales de mayor prestigio científico nacionales o internacionales.

Los 14 capítulos que conforman esta edición son el reflejo de la actividad académica desarrollada por los alumnos e investigadores asociados al posgrado en las diferentes áreas de acentuación que lo conforman: farmacia molecular, farmacia social y tecnología farmacéutica.

En el área de farmacia molecular se presentan seis capítulos, los cuales son: “Variantes genéticas que influyen en el desarrollo de úlcera de pie diabético y neuropatías en pacientes con diabetes mellitus tipo 2”; “Polimorfismos de nucleótido único asociados con el tratamiento para carcinoma de células renales metastásico”; “Análisis de expresión génica en líneas celulares de cáncer de mama”; “Polimorfismo del CYP1a1 Ile462Val y su relación con diversos tipos de cáncer: ¿efecto causante o protector? Una revisión”; “En busca del perfil genético de la preeclampsia” y

“Epigenética en cáncer: una oportunidad para la prevención, tratamiento y nuevas estrategias terapéuticas”.

El área de farmacia social contiene cuatro capítulos que integran temas relacionados con la “Ecofarmacovigilancia de hipolipemiantes (estatinas y fibratos): efectos en organismos acuáticos”; “Tecnovigilancia: el nuevo enfoque del farmacéutico”; “Conocimientos, habilidades y actitudes en farmacovigilancia entre profesionales de la salud y utilidad de las intervenciones educativas como herramienta de mejora de éstos” y “Ketamina usos clínicos en humanos”.

Finalmente, el área de tecnología farmacéutica presenta cuatro capítulos relacionados con la “Disolución intrínseca: revisión de su utilidad en la industria farmacéutica”; “Evaluación del efecto del aglutinante y la velocidad de agitación de un granulador de alto corte en las características fisicoquímicas de un granulado de valproato de magnesio”; “Estudio comparativo del control de la liberación del valproato de magnesio en matrices hidrofílicas de HPC y HPMC” y “Cicloadiciones (3+2) azida-enolato como herramienta para la obtención de compuestos antifúngicos: síntesis de análogos nucleosídicos y del miconazol”.

Agradecemos a todos los revisores de capítulos de diferentes instituciones de educación superior del país, sus esfuerzos que favorecieron el mejoramiento de la calidad de la presente obra.

Ahora corresponde al lector hacer los comentarios finales sobre esta edición, esperando contribuir en el área de la ciencias farmacéuticas con aportaciones de interés para el desarrollo de cada una de las áreas de acentuación de nuestro posgrado.

*Leobardo Manuel Gómez Oliván*

# VARIANTES GENÉTICAS QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE ÚLCERA DE PIE DIABÉTICO Y NEUROPATÍAS EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

*Claudia Miriam Alonzo De la Rosa<sup>1</sup>*  
*Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez<sup>1</sup>*  
*Miriam Verónica Flores Merino<sup>1\*</sup>*

La úlcera diabética es una lesión cutánea donde los procesos de cicatrización se encuentran alterados, además son una de las complicaciones graves que ocurren en personas con diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se ha demostrado que en estos pacientes existen ciertos polimorfismos que confieren susceptibilidad a las úlceras y neuropatías diabéticas. Sin embargo, a pesar de que se han investigado profundamente al respecto, se ha prestado poca atención a los que factores que confieren un efecto protector. El objetivo es realizar una revisión de los polimorfismos de nucleótido único relacionados con el desarrollo de úlcera y neuropatía diabética en pacientes con DM2.

Se realizó una revisión bibliográfica para identificar información entre 2009 y 2018 en diferentes poblaciones, para encontrar la ubicación de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Se utilizó como herramienta, *1000 genomes browser* en PubMed. Se pudo encontrar que los polimorfismos con más frecuencia se localizaron en el cromosoma 6 ( $n = 4$ ). Los polimorfismos en los genes VEGFA y eNOS confieren un efecto protector, lo que puede abrir una oportunidad para el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento de la úlcera y neuropatía diabética.

En conclusión, la búsqueda de SNP en pacientes con úlcera diabética permitió encontrar biomarcadores probablemente asociados con protección en estos pacientes, un meta metanálisis permitirá comprobarlo.

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* clamiriam005@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

La diabetes afecta a la población mundial, siendo una importante causa de muerte. En 2014 se reportó que 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes, se estima que para 2040 la cifra aumentará a 642 millones, con una tasa de mortalidad de una persona cada seis segundos (Bohorquez Robles et al., 2017). En México, en el año 2012, la prevalencia de diabetes fue de 9.2%.

Complicaciones micro y macrovasculares son preponderantes en el cuadro clínico de los pacientes diabéticos. Entre éstas, la úlcera de pie diabético (UPD) es una de las causas más frecuentes de hospitalización (Flores Reyes, Camarillo Romero y Flores Merino, 2015), que en casos crónicos puede derivar en una amputación de la extremidad. Se estima que 1 de cada 20 pacientes con diabetes padecen de afecciones en extremidades inferiores, de acuerdo a una revisión sistemática realizada por Lazzarini en 2015. En México (2012), la tasa de prevalencia de úlceras del pie en personas con diabetes fue 7.2% (Bohorquez Robles et al., 2017). La tasa de supervivencia de los pacientes sometidos a amputación es aproximadamente 50% después de tres años del padecimiento (Yazdanpanah et al., 2018).

Entre los principales factores de riesgo de UPD se encuentra la neuropatía (Yazdanpanah et al., 2018). La neuropatía de los pies combinada con la reducción del flujo sanguíneo incrementan el riesgo de úlceras de los pies, infección y, en última instancia, amputación. Se estima que la neuropatía diabética está presente en el momento del diagnóstico de LDM2 en aproximadamente 10% de los pacientes y afecta 50% con una mayor duración de la enfermedad (Stoian et al., 2015).

La UPD se desarrolla por una combinación de factores, incluyendo los genéticos que pueden jugar un papel muy importante en su evolución. De hecho, se ha demostrado que existen algunos polimorfismos que propician o están relacionados con la úlcera diabética, principalmente en pacientes con diabetes tipo 2.

### Polimorfismos de nucleótido único

Los polimorfismos son mutaciones o cambios en el DNA, que constituyen factores genéticos asociados con la susceptibilidad o la predisposición a ciertas enfermedades, una de ellas es DM2 (Rosero y Corredor, 2016). Los polimorfismos de nucleótido

simple (SNP) son alteraciones de un solo nucleótido, que pueden localizarse tanto en genes codificantes, como en no codificantes de proteínas y se dividen en neutras y funcionales (Hernández Romano, Martínez Barnetche y Valverde Garduño, 2009).

La frecuencia aproximada de los SNP es de 1 en 1000 pb y representan el tipo de variación más abundante en los humanos. Un SNP en una región codificante puede representar un cambio en la secuencia de una proteína, lo que puede ocasionar una alteración en su función. De hecho, casi todas las enfermedades de origen monogénico se deben a mutaciones que modifican la secuencia y función de una proteína (Hernández Romano, Martínez Barnetche y Valverde Garduño, 2009).

La búsqueda de SNP emplea métodos de secuenciación directo, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), el clivaje químico (CCM), el clivaje por RNAsa y oligonucleótido alelo específicos para hibridación (ASO); sin embargo, la técnica más utilizada en la detección de un SNP, es la reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP = útil para el diagnóstico de mutaciones, deleciones o inserciones cortas que generan o eliminan un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción) (Rosero y Corredor, 2016).

## METODOLOGÍA

### Fuente de datos y selección de estudios

Se realizó una revisión sistemática de estudios de asociación genética realizados en poblaciones residentes en diferentes países (India, Egipto, Alemania, Irlanda, Irán, Turquía, Nueva York, China e Italia), siguiendo el protocolo de Revisiones Sistemáticas de Estudios de Asociación Genética (Sevilla, 2007). Se hicieron búsquedas en diferentes bases de datos como National Center for Biotechnology Information (NCBI), PubMed, Scopus, Elsevier.

Se efectuó la búsqueda bibliográfica para identificar todos los posibles estudios relacionados con polimorfismos asociados con UPD en diferentes poblaciones. Las investigaciones incluidas abarcan desde el año 2008 al año 2018.

## Criterios de selección

Los estudios se incorporaron si cumplían los siguientes criterios: 1) se investigó la asociación entre polimorfismos y la UPD en diferentes poblaciones; 2) se estudiaron polimorfismos que se asociaban con la úlcera diabética, sin embargo después del estudio se descartaron por su nula asociación; 3) se ahondó en la asociación entre polimorfismos y el grado de severidad de la úlcera diabética; 4) se averiguaron polimorfismos asociados a la neuropatía diabética; 5) también, los estudios originales que contienen datos independientes; 6) fueron un diseño de casos y controles o de cohortes. Los estudios se excluyeron si eran publicaciones duplicadas, sólo se hablaba de polimorfismos asociados con diabetes tipo 2.

## Extracción de datos

Se extrajeron los siguientes datos de estudios seleccionados: primer autor, año de publicación, diseño de estudio, características de la población (número de casos y controles), país en el que se llevó a cabo el estudio, gen y su localización, polimorfismo y su asociación o no con úlcera y neuropatía diabética.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características de los estudios

**Tabla 1.**  
Características de los estudios de polimorfismos asociados a neuropatía y úlcera en pie diabético llevados a cabo en la India

<i>Autor</i>	<i>Tipo de estudio</i>	<i>País/ región</i>	<i>Gen</i>	<i>Localización del gen</i>	<i>Poliformismo</i>	<i>Asociación con úlcera diabética*/neuropatía**</i>
K. A. Mir et al., 2009	Prospectivo (UPD = 101)	India	HSPA1B	Cromosoma	G1538A	Se asocia con la gravedad de la ulceración en pie diabético
			HSPA1L	6q21.3	C2437T	No se asocia con la gravedad de la ulceración en pie diabético

*Continúa...*

<i>Autor</i>	<i>Tipo de estudio</i>	<i>País/ región</i>	<i>Gen</i>	<i>Localización del gen</i>	<i>Poliformismo</i>	<i>Asociación con úlcera diabética */neuropatía**</i>
K. Singh et al., 2013	Caso-control (n = 730, DM2 y CS = 149, UPD = 110, DM2 y OCS = 204, C = 267)	India	MMP9	Cromosoma 20q13.1	SNP- 1562C>T (rs3918242)	Sí*
K. Singh et al., 2013	Caso-control (n = 750, DM2 = 322, UPD = 120, C = 308)	India	TCF7L2	Cromosoma 10q25.2-q25.3	rs7903146 (C/T)	Sí*
S. Pichu, et al., 2015	Caso-control (n = 224, DM2 = 79, UPD = 79, C = 66)	India	HIF-1 $\alpha$	Cromosoma 14q.23	Pro582Ser (C1772T rs11549465) en el Exón- 12	Sí*
U. Damod- haran et al., 2015	Caso-control (n = 515, DM2 = 139, ND = 191, EVP y DM2 = 79, C = 106)	India	IL-6	Cromosoma 7p15.3	-174G/C (rs1800795)	Sí*
			TNF- $\alpha$	Cromosoma 6p21.3	-308G/A (rs1800629)	Sí*
			SDF-1/ CXCL1	Cromosoma 10q11.2	-238 G/A (rs361525)	No*
S. Pichu, et al., 2017	Caso-control (n = 906, DM2 = 305, UPD = 301, C = 300)	India	LOX	Cromosoma 5q23.2	G473A, (rs1800449) localizado en el exón 1	Sí*

n = total de pacientes, DM2 = diabetes mellitus tipo 2, UPD = úlcera de pie diabético, C = pacientes control, OCS = otras complicaciones secundarias, CS= complicaciones secundarias, eVp = enfermedad vascular periférica  
Elaboración propia.

Se llevó a cabo una revisión de diecisiete estudios con un total de 4 071 participantes y 1 789 controles. La mayoría de los estudios (n = 14, 82.3%) utilizó un diseño de casos y controles. En relación con el lugar, seis se realizaron en la India, tres en Turquía, dos en Irán, uno en Irlanda, Egipto, Alemania, Nueva York, China y en Italia (tabla 2 y 3).

**Tabla 2.**  
**Características de los estudios de polimorfismos asociados a neuropatía y UPD en el mundo**

<i>Autor/año</i>	<i>Tipo de estudio</i>	<i>País/región</i>	<i>Gen</i>	<i>Localización del gen</i>	<i>Poliformismo</i>	<i>Asociación con úlcera diabética*/ neuropatía**</i>
D. Corapcioglu et al., 2010	Caso-control (n = 199, UPD = 97, C = 102)	Turquía	eNOS	Cromosoma 7q.35-36	G894T	No*
M. M. Amoli, et al., 2011	Caso-control (n = 586, UPD = 247, DM2 = 241, C = 98)	Irlanda	VEGFA	Cromosoma 6p21.1	-2578 C/A	Efecto protector*
			VEGFB	Cromosoma 11q13.1	-7 C/A	No*
M. A. Küper et al., 2012	Prospectivo (92 pacientes consecutivos)	Alemania	f13a1 Factor XIII A)	Factor XIII A (Cromosoma 6p.24)	Val34Leu rs5985	Sf*
C. Ciccacci et al., 2012	Caso-control (n = 325, DM2 = 154, C = 171)	Italia	TCF7L2	Cromosoma 10q25.2-q25.3	C/T rs7903146	Sf**
					T/C rs7901695	No**
M. Erdogan et al., 2014	Caso-control (n = 150, DM2 = 50, UPD = 50, C = 50)	Turquía	PPAR gamma	Cromosoma 3q.25	Pro12Ala rs1801282 (exón 2)	No*
					C478T (exón 6)	No*
S. Maryam, et al., 2015	Caso-control (n = 257, UPD = 123, C = 134)	Irán	eNOS (exón 7)	Cromosoma 7q.36	Glu298Asp (G894T)	Efecto protector*
G. Tamagno et al., 2015	Caso-control (n = 305, DM2 = 202, UPD = 103)	Nueva York	COL1A1	Cromosoma 17q.22	G348T exón 2	No*
Y. Jia et al., 2015	Cohorte (DM2 = 295)	China	GRP78	Cromosoma 9q.33	C/T rs391957	Sf**
E. Mehmet et al., 2016	Caso-control (n = 150, DM2 = 50, UPD = 50, C = 50)	Turquía	Gen de la apolipoproteína E	Cromosoma 19q.13.3	E2 y E4. Estos alelos difieren por polimorfismos presentes en la posición 112 y 158 de la secuencia de aminoácidos.	No*

*Continúa...*

<i>Autor/año</i>	<i>Tipo de estudio</i>	<i>País/región</i>	<i>Gen</i>	<i>Localización del gen</i>	<i>Poliformismo</i>	<i>Asociación con úlcera diabética*/ neuropatía**</i>
N. Soroush et al., 2017	Caso-control (n = 212, UPD = 105, C = 107)	Irán	Gen del receptor de vitamina D (VDR)	Cromosoma 12q13.1	FokI C>T rs2228570	Si*
Mohamed Naguib, et al., 2017	Caso-control (n = 90, DM2 = 30, UPD = 30, C = 30)	Egipto	TLR2 TLR9	Cromosoma 4q31.3-q32 Cromosoma 3q21.2	1350 T/C, rs3804100 1237 T/C, rs5743836	No* Si*

n = total de pacientes, DM2 = diabetes mellitus tipo 2, UPD = úlcera de pie diabético, C = pacientes control  
Elaboración propia.

## Evaluación genética y asociaciones

Ningún estudio realizó una exploración del genoma completo; sin embargo, se utilizó un enfoque de gen candidato. Un total de veintiséis polimorfismos en veinte genes fueron estudiados por su asociación con la úlcera de pie diabético y neuropatía diabética. La mayoría de los estudios (82.3%) determinaron los polimorfismos mediante reacción en cadena de la polimerasa seguido de un análisis de enzimas de restricción.

El mayor número de polimorfismos estudiados se localizaron en el cromosoma 6 (23.07%). En cada uno de los cromosomas, 10, 20, 12, 7, 14 y 5, se encontró un polimorfismo asociado a úlcera diabética (23.07%). Además, se observó un polimorfismo en el cromosoma 6 y uno en el cromosoma 7, que confieren efecto protector contra la UPD (7.7% del total de los estudios incluidos). Por otro lado, en los cromosomas 9 y 10 se encontraron dos polimorfismos asociados al desarrollo de UPD (15.4%).

De los veintiséis polimorfismos estudiados nueve no se asociaron con la predisposición a la úlcera diabética (34.6%), dos tuvieron un efecto protector contra la úlcera diabética (7.7%) y de los cuatro polimorfismos que se esperaba que se relacionaran con el desarrollo de neuropatía diabética, dos se asociaron con esta complicación (7.7%). Los polimorfismos que conceden un efecto protector contra el desarrollo de úlcera diabética fueron -2578 C/A localizado en el cromosoma 6 y Glu298Asp, G894T en el cromosoma 7. Mientras que de los cuatro polimorfismos

que se estudiaron para conocer su asociación con el desarrollo de neuropatía diabética, tres se encontraron en el cromosoma 10 (C/T rs7903146; T/C rs7901695; G/T rs12255372) y uno se encontró en el cromosoma 9 (C/T rs391957).

Los polimorfismos no asociados con UPD incluyeron E1 y E4 (cromosoma 19), G894T (cromosoma 7), -7 C/A (cromosoma 11), -238 G/A, rs361525 (cromosoma 6), 1350 T/C, rs3804100 (cromosoma 4), Pro12Ala rs1801282 en el exón 2 y C478T en el exón 6 (cromosoma 3), G348T exón 2 (cromosoma 17) y C2437T (cromosoma 6); los polimorfismos no asociados con neuropatía diabética, incluyeron T/C rs7901695 y G/T rs12255372, ambos en el cromosoma 10. Con lo anterior, se demuestra que en el 42% de los estudios, los polimorfismos se relacionaron con el desarrollo de úlcera diabética y 11.53% se vinculó al desarrollo de neuropatía diabética. En el 34.6% de los estudios no se encontró una ligazón entre los polimorfismos estudiados y el desarrollo de úlcera diabética; y en el 7.7%, se encontraron polimorfismos con efecto protector. Además, en el 11.53% no se halló correspondencia entre los polimorfismos y el desarrollo de neuropatía diabética.

En cuanto a los genes en los que se localizaron los polimorfismos se estudiaron dos en el gen eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial), cuatro en TCF7L2 (factor de transcripción 7 tipo 2), uno en el gen de la apolipoproteína E, uno en MMP9 (matriz metaloproteínasa 9), uno en VEGFA (gen del factor de crecimiento endotelial tipo A), uno en VEGFB (gen del factor de crecimiento endotelial tipo B), uno en VDR (gen del receptor de vitamina D), uno en IL-6 (Interleucina 6), dos en TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), uno en CXCL1 (proteína alfa regulada por el crecimiento), uno en TLR2 (receptor tipo Toll), uno en TLR9 (receptor tipo Toll), uno en f13a1 (factor XIII A), dos en PPAR (proliferador de peroxisoma), uno en COL1A1 (gen de colágeno tipo I alfa 1), uno HSPA1B, uno en HSPA1L (proteína de choque térmico), uno en HIF-1 $\alpha$  (factor inducible por la hipoxia-1 alfa), uno en LOX (lisil oxidasa) y otro en GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa) (figura 1).

De acuerdo a la localización en los cromosomas, dos polimorfismos se encontraron en el cromosoma 2 (-308G/A, rs1800629 y Val34Leu); uno en el cromosoma 10 (rs7903146 C/T; 801 G/A, rs1801157); uno en el cromosoma 20 (SNP-1562C>T rs3918242); uno en el cromosoma 12 (FokI C>T, rs2228570); uno en el cromosoma 7 (-174G/C, rs1800795); tres en el cromosoma 6 (-308G/A, rs1800629, Val34Leu; G1538A), de los cuales uno se asocia con la gravedad de ulceración (G1538A); uno en el exón 12 del cromosoma 14 (Pro582Ser, C1772T, rs11549465); uno en el exón

1 del cromosoma 5 (G473A, rs1800449) y otro en el cromosoma 9 (C/T rs391957). Por otro lado, K. A. Mir y colaboradores, agruparon a los pacientes según el grado de severidad de la úlcera diabética de acuerdo a la escala de Wagner, encontraron que el polimorfismo HSPA1B se asoció con un mayor grado de gravedad de la ulceración del pie diabético (Mir et al., 2009).

### Polimorfismos asociados al desarrollo de úlcera y neuropatía diabética

En India en el 2013, Kanhaiya Singh y su equipo llevaron a cabo un estudio de casos y controles en el que se demostró que hay una correspondencia directa del polimorfismo rs7903146 (C/T) en el gen TCF7L2 (factor de transcripción 7 tipo 2) y el desarrollo de úlcera diabética en pacientes con diabetes tipo 2, ya que la frecuencia del genotipo TT de rs7903146 (C/T) fue significativamente mayor en los pacientes con úlcera diabética (10.8%), comparado con los pacientes controles (5.2%) (Singh et al., 2013).

En Italia, 2012, Ciccacci llevó a cabo un estudio caso-control en el que se analizaron tres polimorfismos en el gen TCF7L2 (factor de transcripción 7 tipo 2): C/T rs7903146, T/C rs7901695, G/T rs12255372. En este estudio se encontró una fuerte correlación entre el rs7903146 y la presencia de neuropatía autonómica cardiovascular. La variante rs7901695 se asoció con el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y enfermedad arterial coronaria. Mientras que los sujetos portadores de la variante rs12255372 se vincularon con un riesgo de desarrollar retinopatía diabética (Ciccacci et al., 2013).

Cabe mencionar que el factor de transcripción 7 tipo 2 (TCF7L2) forma parte de la cascada de señalización de  $\beta$ -catenina y participa en la modulación de la expresión de interleucina-1, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento vascular endotelial y recientemente su papel se ha atribuido a la reparación y regeneración de heridas; es por ello que los polimorfismos en este gen han sido ligados al desarrollo de diabetes tipo 2 y sus complicaciones secundarias como la úlcera diabética (Kiran Singh et al., 2013).

En Turquía, Erdogan Mehmet (2015) y compañeros evaluaron la asociación de polimorfismos en el gen de ApoE y el desarrollo de neuropatía diabética, por medio de un estudio de casos y controles (Mehmet et al., 2016). En este estudio se reveló que

el polimorfismo ApoE4 está asociado con neuropatía periférica grave en pacientes con diabetes tipo 2 (Mehmet et al., 2016). El gen ApoE (apolipoproteína E) presenta 3 alelos comunes que se traducen en isoformas de la proteína: normal E3; disfuncional E2 y E4. Estos alelos difieren por polimorfismos presentes en la posición 112 y 158 de la secuencia de aminoácidos: Apo E3, presenta cisteína en la posición 112 y arginina en la posición 158 (normal), Apo E2, cisteína en la posición 158 y Apo E4, arginina en la posición 112.

La apolipoproteína E o ApoE es una proteína compleja que pertenece a una clase de apolipoproteínas localizadas en los quilomicrones y en las lipoproteínas de densidad intermedia (LDL). Es producida por hígado, macrófagos y astrocitos en el cerebro. La principal función de ApoE es el transporte de colesterol a las neuronas a través de los receptores ApoE y el metabolismo lipídico mediado por ligandos. Éste es producido por el gen ApoE con 4 exones. El alelo ApoE-3 es el más común o de tipo salvaje, asociado con niveles de lípidos normales, mientras que ApoE-2 está relacionado con la hipodislipidemia y el alelo ApoE-4 con hiperdislipidemia (Dhillon y Singh, 2018).

En Turquía, en 2010, se evaluó la asociación del polimorfismo G894T en el gen eNOS y en el desarrollo de úlcera de pie diabético. Se encontró diferencia significativa en la distribución de alelos en pacientes con enfermedad cardíaca aterosclerótica comórbida, en donde la frecuencia de los alelos GT-TT fueron significativamente más altos que los alelos GG. Sin embargo, se concluyó que la presencia del polimorfismo no se asoció con la úlcera diabética ni con otras complicaciones de la diabetes, excepto cuando hay presencia de aterosclerosis cardíaca (Corapcioglu et al., 2010).

En Irán en 2015, Seyedeh Maryam y colaboradores encontraron que los pacientes con diabetes tienen al menos un alelo T en el polimorfismo eNOS Glu2983Asp y una menor frecuencia de úlcera diabética. Por lo tanto, el alelo T se puede considerar como un factor de protección para esta complicación. Además, no se encontró ninguna asociación significativa entre este polimorfismo y el estrés oxidativo, que puede deberse en parte al pequeño tamaño de la muestra.

El óxido nítrico (ON) desempeña un papel fundamental en la regulación de la función endotelial y el tono vascular en muchos órganos, incluido el riñón. El ON inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos al endotelio vascular y la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL). El ON derivado de endotelio se sintetiza a partir de L-arginina mediante ON sintasa codificada por el gen endotelial ON sintasa (eNOS o NOS3), mapeado al cromosoma 7q36 (Thameem et al., 2008).

En India, en 2013, se evaluó la asociación del polimorfismo -1562C>T en la región promotora del gen MMP-9 (matriz metaloproteínasa 9) y el desarrollo de UPD. Se encontró que SNP-1562C>T afecta la expresión de MMP-9 y se asocia con diabetes tipo 2 y úlcera de pie diabético. En presencia del alelo T la transcripción aumentada del gen MMP-9 podría conducir a una degradación excesiva de la síntesis de nueva matriz en el tejido de granulación. La alta frecuencia y la expresión del alelo T de SNP -1562C>T en el gen MMP-9 se asociaron con una mayor producción de MMP-9 en fluidos de heridas de individuos con diabetes tipo 2, que promueven la degradación de la matriz y el desarrollo de heridas crónicas (Kanhaiya Singh et al., 2013). MMP-9 son enzimas proteolíticas que participan en la remodelación del tejido conectivo y en la degradación de la matriz extracelular. El polimorfismo de nucleótido único funcional (SNP) -1562C>T en el promotor del gen MMP-9 da como resultado una pérdida de unión de una proteína nuclear y un aumento en la actividad transcripcional (Kanhaiya Singh et al., 2013).

En Irán, en 2011, se evaluó la asociación de los polimorfismos -7\*C/A y -2578\*C/A en el gen del factor de crecimiento endotelial (VEGFA) y el desarrollo de úlcera de pie diabético. Se encontró que la distribución del polimorfismo -2578\*C/A en el gen VEGF fue significativamente diferente entre pacientes con úlcera diabética y controles. La frecuencia del genotipo AA disminuyó significativamente en pacientes, en comparación con pacientes diabéticos sin ella, lo que confiere un efecto protector. También, hubo una disminución significativa en la frecuencia del alelo A en pacientes con úlcera diabética en comparación con los pacientes diabéticos sin ésta. No existieron diferencias significativas para las frecuencias de alelos y genotipos del polimorfismo 7 \* C/T entre pacientes y controles (Amoli et al., 2011). Parece que la frecuencia más baja del alelo A en pacientes con UPD confiere un efecto protector que podría ser como resultado del aumento del angiogénesis que llevan este alelo. Los datos sugieren una importancia pronóstica para el polimorfismo VEGF -2578 \*C/A en el desarrollo de úlcera diabética (Amoli et al., 2011).

El VEGF es producido por endotelio vascular, pericitos, epitelio pigmentario de la retina, macrófagos, células T y otras células. Además de la inducción de la permeabilidad, el VEGF es un mitógeno para las células endoteliales vasculares. Los receptores de VEGF (VEGFR-1 y -2) se encuentran exclusivamente en las células endoteliales. VEGFR-1 (FLT) parece mediar la hiperpermeabilidad vascular y VEGFR-2 (FLK-1) podría estar involucrado en la angiogénesis. El VEGF también

induce colagenasas y promueve la angiogénesis al eliminar la matriz, facilitando la migración y el crecimiento de células endoteliales (Amoli et al., 2011).

En Irán (2016), Negin Soroush y colaboradores encontraron una asociación entre el polimorfismo FokI (rs2228570 C>T) del gen receptor de vitamina D (VDR) y úlcera diabética. Los resultados revelaron que las frecuencias de los genotipos TT y TC fueron significativamente mayores en el grupo de casos en comparación con los controles. Además, se observó una correlación significativa entre el alelo T y el grado de úlcera de Wagner que muestra una alta frecuencia del alelo T en pacientes con úlceras de grado 3 (Soroush et al., 2017).

La vitamina D contribuye a la regulación y diferenciación celular. Por lo tanto, la destrucción mediada por inmunidad de las células  $\beta$  productoras de insulina está influenciado por la deficiencia de vitamina D (Ali, Fawzy, Mohsen y Settin, 2018). La actividad antioxidante de la vitamina D fue dilucidada por su capacidad para modular la formación de radicales libres y regular positivamente la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa en la SG (Soroush et al., 2017).

En India en 2015, Umapathy Dhamodharan y colaboradores llevaron a cabo un estudio de casos y controles en el que evaluaron la asociación de los polimorfismos en IL-6 (-174G/C; rs1800795), TNF- $\alpha$  (-308G/A, rs1800629 y -238 G/A, rs361525) y SDF-1/CXCL12 (-801 G/A, rs1801157), y el desarrollo de úlcera diabética. Se encontró que el alelo -174 "C" de IL-6 y el alelo 801 "A" de SDF-1, parecen conferir cierta protección contra la diabetes, pero no contra la úlcera diabética. Por otro lado, el alelo "A" 308 (pero no el SNP-238) en TNF- $\alpha$  parece conferir susceptibilidad genética a ambas condiciones. En general, los SNPs de IL-6, TNF- $\alpha$  y SDF-1, además de controlar los niveles de citoquina en suero, afectaron a diversos factores de riesgo de úlcera de pie diabético, incluido el control glucémico, el perfil lipídico sérico, la función renal, la salud vascular y la obesidad (Dhamodharan, Viswanathan, Krishnamoorthy, Rajaram y Aravindhana, 2015).

La interleucina 6 (IL-6) es una citosina que tiene un papel importante en la regulación del sistema inmune y el sistema nervioso. Además, es capaz de controlar la amplitud de la respuesta inflamatoria aguda, ejerciendo, por tanto, un efecto antiinflamatorio. Por otra parte, su sobreproducción puede ser el causante primario de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Rose John, 2012).

El TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) es una citoquina que produce varias células del sistema inmune, principalmente macrófagos y monocitos. Es un potente

mediador proinflamatorio secretado por los macrófagos M1 activados, que desempeña una variedad de efectos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación y múltiples efectos proinflamatorios. Su producción exagerada lleva a enfermedades inflamatorias crónicas (Wu et al., 2015).

SDF-1/CXCL1 juega un papel importante en la angiogénesis mediante el reclutamiento de células progenitoras endoteliales (CPE) de la médula ósea, a través de un mecanismo dependiente de CXCR4 (receptor).

M. N. A. Wifi e investigadores analizaron la asociación del polimorfismo del gen TLR2 (1350 T/C, rs3804100) y TLR9 (1237 T/C, rs5743836) y la predisposición a padecer diabetes tipo 2 y pie diabético. Se encontró que existe una asociación entre el polimorfismo TLR9-1237 T/C y el riesgo de padecer pie diabético (Wifi, Assem, Elsherif, El-Azab y Saif, 2017).

Los receptores tipo Toll (TLR2 y TLR9) son una familia de receptores transmembrana genéticamente conservados que participan en la inmunidad innata y el reconocimiento de patógenos. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos mediante TLR activa eventos de señalización que inducen la expresión de moléculas efectoras, tales como citoquinas y quimiocinas, que controlan las respuestas inmunes adaptativas (Wifi, Assem, Elsherif, El-Azab y Saif, 2017).

TLR2 es un miembro extracelular importante en la familia de receptores ricos en leucina que poseen los mamíferos. Se sabe que es un receptor de señalización para muchos productos microbianos, incluidas las bacterias grampositivas enteras y el micoplasma (Wifi et al., 2017). TLR9 está expresado principalmente en células B y células mieloides en humanos, a su vez está involucrado tanto en respuestas inflamatorias sistémicas como locales. Además, es un miembro endosomal importante de la familia de TLR que causa la necrosis de la herida promoviendo la inflamación. Los hallazgos de la expresión aumentada de TLR9 dependiendo del grado de la herida en pie diabético sugiere que la expresión de TLR9 modula directamente los procesos involucrados con la úlcera diabética.

En Alemania, M. A. Küper y colaboradores llevaron a cabo un estudio prospectivo en el que se evaluó la relación entre el polimorfismo Val34Leu, la tasa de activación de FXIII y las mediciones de oxígeno transcutáneo en pacientes con UPD. En este estudio se encontró que el polimorfismo Val34Leu se asocia con un aumento de la activación del factor XIII plasmático, probablemente relacionado con una microcirculación cutánea alterada en pacientes con úlceras del pie diabético (Küper, Schüle, Mayer, Königsrainer y Beckert, 2012).

El factor XIII (FXIII) es un tetrámero de dos subunidades A y dos B, con actividad catalítica localizada en las subunidades A (Küper, Schüle, Mayer, Königsrainer y Beckert, 2012). El FXIII activado reticula varios sustratos de la fibrina de tipo trombo, factor V o proteínas plaquetarias específicas. Éste, tiene una posición sobresaliente en la cascada de la coagulación al estabilizar los coágulos de fibrina y protegerlos contra la fibrinólisis prematura (Küper, Schüle, Mayer, Königsrainer y Beckert, 2012).

Mehmet Erdogan y colaboradores llevaron a cabo un estudio de caso control en el que examinaron la contribución de los polimorfismos Pro12Ala (C>G, rs1801282) en el exón 2 y C478T en el exón 6 del gen PPARgamma al desarrollo de las UDP. Se encontró que el polimorfismo del gen del exón 2 y del exón 6 de PPARgamma no se asoció con el riesgo del desarrollo de pie diabético en el grupo de pacientes diabéticos tipo 2. El estudio sugiere que el alelo G puede desempeñar un papel específico en la determinación de la susceptibilidad diabética, pero no parecen ser importantes en las manifestaciones clínicas del desarrollo de éste (Erdogan, Eroglu, Solmaz, Ganidagli, Tetik, y Canataroglu, 2014).

El PPAR es un factor de transcripción importante para el metabolismo de los lípidos y la glucosa. Los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR) son receptores de ácidos grasos nucleares y desempeñan un papel importante en enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina y la enfermedad arterial coronaria (Erdogan, Eroglu, Solmaz, Ganidagli, Tetik y Canataroglu, 2014).

En Alemania, en el 2015, G. Tamagno y colaboradores llevaron a cabo un estudio caso control en el que se examinó la contribución del polimorfismo G348T en el exón 2 del gen COL1A1-Sp1 (factor de transcripción) en el desarrollo de síndrome de pie diabético. Lo que se encontró fue que el polimorfismo de COL1A1 no se correlaciona con el desarrollo de úlcera diabética en población de pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, no se puede excluir el impacto de otros factores genéticos, que tal vez afecten a otros componentes del tejido conectivo (Tamagno et al., 2015).

El gen del colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1) codifica las cadenas proalfa1 del colágeno tipo I cuya triple hélice comprende dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2. El colágeno tipo I como colágeno formador de fibrillas se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos y es abundante en huesos, córnea, dermis y tendones (He, Wang, Zhao, Chen y Wu, 2014).

En India, en 2009, K. A. Mir y su equipo llevaron a cabo un estudio prospectivo en el que se examinó la hipótesis de que los polimorfismos G1538A en HSPA1B y

C2437T en el gen HSPA1L podría predisponer a la gravedad de la ulceración del pie diabético. Lo que se encontró fue que el genotipo HSPA1B se asoció con la gravedad de la ulceración del pie diabético, la necesidad de amputación y la duración de la hospitalización en estos pacientes. Por otro lado, el genotipo HSPA1L no se asoció con la gravedad de la ulceración del pie diabético (Mir et al., 2009).

La proteína de choque térmico (HSP) 70 está involucrada en la respuesta al estrés y en la reparación de heridas. Además, HSP70 funciona como una molécula crítica en las vías relacionadas con la inflamación. La producción excesiva de citoquinas inflamatorias está implicada en la patogenia de la ulceración grave del pie diabético (Mir et al., 2009).

En India (2015), Sivakamasundari Pichu e investigadores, llevaron a cabo un estudio caso control en el que se evaluó la asociación del polimorfismo Pro582Ser (C1772T, rs11549465) en el exon-12 del gen HIF-1 $\alpha$  y el desarrollo de úlcera diabética. Lo que se encontró fue que los polimorfismos del gen HIF-1 $\alpha$  pueden conferir susceptibilidad a úlcera diabética, lo que puede tener implicaciones importantes para comprender la patogénesis de este y otras complicaciones relacionadas con condiciones hipóxicas (Pichu, Sathiyamoorthy, Krishnamoorthy, Umaphathy y Viswanathan, 2015).

En estudios previos, se demostró que el polimorfismo HIF1A Pro582Ser tiene un efecto sobre la nefropatía diabética, lo que desencadena la ulceración diabética en la mayoría de los casos (Gu et al., 2013).

El factor inducible por la hipoxia-1 es una proteína compuesta por dos subunidades: HIF-1a y HIF-1b. En una situación de normoxia, la HIF-1a se degrada por hidroxilación y es destruida, mientras que cuando se encuentra en una situación de falta de oxígeno como es el caso de la hipoxia, la HIF-1a no se degrada, sino que uniéndose a la HIF-1b da lugar a la HIF-1 y es cuando realmente da lugar a la activación y estimulación de diferentes genes (Pichu et al., 2015).

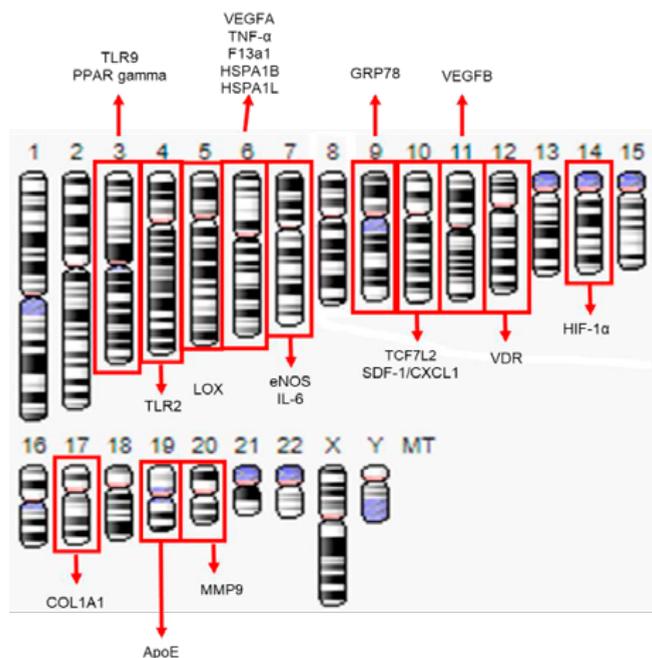
La actividad del gen LOX es importante para mantener las características extensibles y elásticas de los tejidos conectivos de los sistemas esquelético, pulmonar y cardiovascular. El gen LOX desempeña un papel principal en la reparación de la herida dérmica al regular la proliferación celular, la metástasis y la angiogénesis (Pichu, Sathiyamoorthy, Vimalraj, Viswanathan y Chatterjee, 2017).

En 2015, en China, Yujie Jia y su equipo llevaron a cabo un estudio en el que encontraron que el polimorfismo rs391957 del gen GRP78 (proteína regulada por

glucosa de 78 kDa) es un factor de riesgo potencial para la neuropatía periférica diabética tipo 2 (Jia, Tong y Min, 2015). GRP78 es una proteína sensible a la glucosa y con frecuencia altamente expresada en células tumorales, sus funciones en la regulación metabólica de glucosa y glutamina siguen siendo poco conocidas (Li et al., 2015).

La proteína 78 regulada por glucosa (GRP78), también conocida como proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina, es un miembro de la familia de la proteína 70 de choque térmico y se localiza en el retículo endoplásmico (RE). GRP78 ha sido implicado en el plegamiento y transporte de proteínas y desempeña un papel esencial como regulador en la homeostasis del RE (Niu et al., 2015).

Figura 1. Localización de los genes de los estudios incluidos



Elaboración propia.

## CONCLUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio sugieren que los polimorfismos en los genes TCF7L2, MMP9, gen del receptor de vitamina D (VDR), IL-6, SDF-1/CXCL1, TLR9 f13a1 (factor XIII A), f13b1 (factor XIII B), HIF-1 $\alpha$  y LOX predisponen a la úlcera diabética. Así mismo, los polimorfismos en los genes GRP78 (C/T; rs391957C/T) y TCF7L2 (C/T; rs7903146) son proclives a la neuropatía diabética. Por otra parte, dos polimorfismos encontrados en los genes VEGFA (-2578 C/A) y eNOS (Glu298Asp; G894T) sugieren un efecto protector. A pesar de los estudios que se encuentran en la literatura, una mayor investigación a gran escala es necesaria para que se identifiquen polimorfismos de susceptibilidad específicos para diferentes poblaciones.

Los polimorfismos con efecto protector podrían ser una nueva alternativa de tratamiento para pacientes con diabetes tipo 2. Se puede dar un enfoque en la terapia génica, que es una poderosa herramienta para tratar enfermedades neurodegenerativas. El tratamiento puede en el suministro de un transgen que reemplaza o corrige un gen defectuoso o generalmente apoya a las células en el entorno de la enfermedad (O'Connor y Boulis, 2015). Por otra parte, el estudio genético puede emplearse como herramienta para la prevención en pacientes que tengan polimorfismos asociados a la úlcera diabética.

## REFERENCIAS

- Ali, R.; Fawzy, I.; Mohsen, I. y Settin, A., 2018. Evaluation of vitamin D receptor gene polymorphisms (Fok-I and Bsm-I). *T1DM Saudi children. Journal of Clinical Laboratory Analysis* [en línea], (January), 1-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jcla.22397>
- Amoli, M. M.; Hasani-Ranjbar S.; Roohipour, N.; Sayahpour F. A.; Amiri, P.; Zahedi, P.; ... Tavakkoly-Bazzaz, J., 2011. VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. *Diabetes Research and Clinical Practice* [en línea], 93 (2), 215-219. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.04.016>
- Bohorquez Robles, R.; Compeán Ortiz, L. G.; González Quirarte, N. H.; Berry, D. C.; Aguilera Pérez, P. y Piñones Martínez, S., 2017. Knowledge and Practices of Diabetes Foot Care and Risk of Developing Foot Ulcers in México May Have Implications for

- Patients of Mexican Heritage Living in the US. Diabetes Educator. *Revista Gaúcha de Enfermagem* [en línea], 43 (3), 297-303. <https://doi.org/10.1177/0145721717706417>
- Ciccacci, C.; Di Fusco, D.; Cacciotti, L.; Morganti, R.; D'Amato, C.; Novelli, G.; ... Borgiani, P., 2013. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: Association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Acta Diabetologica* [en línea], 50 (5), 789-799. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00592-012-0418-x>
- Corapcioglu, D.; Sahin, M.; Emral, R.; Celebi, Z. K.; Sener, O. y Gedik, V. T., 2010. Association of the G894T Polymorphism of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene with Diabetic Foot Syndrome Foot Ulcer, Diabetic Complications, and Comorbid Vascular Diseases: A Turkish Case-Control Study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* [en línea], 14 (4), 483-488. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2010.0023>
- Dhamodharan, U.; Viswanathan, V. ; Krishnamoorthy, E.; Rajaram, R. y Aravindhan, V., 2015. Genetic association of IL-6, TNF- $\alpha$  and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. *Gene* [en línea], 565 (1), 62-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.063>
- Dhillon, H. y Singh, S., 2018. Role of Apolipoprotein E in the tangled mystery of pain. *Medical Hypotheses* [en línea], 114 (February), 58-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.02.033>
- Erdogan, M.; Eroglu, Z.; Solmaz, S.; Ganidagli, S.; Tetik, A. y Canataroglu, A., 2014. The Relationship of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma 2 Exon 2 and Exon 6 Gene Polymorphism in Type 2 Diabetic Patients with and without Diabetic Foot Ulcers. *Medicine Science | International Medical Journal* [en línea], 3 (4), 1. Disponible en: <https://doi.org/10.5455/medscience.2014.03.8175>
- Flores Reyes, M.; Camarillo Romero, M. S. y Flores Merino, J. F. M. V., 2015. Sustitutos de piel poliméricos para el tratamiento de úlcera en pie diabético. *Revista de Medicina e investigación* [en línea], 3 (205), 74-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mei.2015.02.006>
- G., T.; K., F.; M., E.; J., G.; A., H.; K., L. y P. H., K., 2015. The polymorphism of type 1 collagen (COL1A1) gene does not correlate with an increased risk of foot ulcers in patients with diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* [en línea], 123 (4), 240-245. Disponible en: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecordyfrom=exportyid=L603691243%255Cnhttp://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1395582%255Cnhttp://sfx.umd.edu/hs?sid=EMBASEyissn=14393646yid=doi:10.1055%252Fs-0034-1395582yatitle=The+polymorphism+of+type+1+collagen+%252>

- Gu, H. F.; Zheng, X.; Seman, N. A.; Gu, T.; Botusan, I. R.; Sunkari, V. G.; ... Catrina, S. B., 2013. Impact of the hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF1A) Pro582Ser polymorphism on diabetes nephropathy. *Diabetes Care* [en línea], 36 (2), 415-421. Disponible en: <https://doi.org/10.2337/dc12-1125>
- He, M.; Wang, Z.; Zhao, J.; Chen, Y. y Wu, Y., 2014. COL1A1 polymorphism is associated with risks of osteosarcoma susceptibility and death. *Tumor Biology* [en línea], 35 (2), 1297-1305. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1172-6>
- Hernández Romano, J.; Martínez Barnetche, J. y Valverde Garduño, V., 2009. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Publica de Mexico* [en línea], 51 (SUPPL.3), 455-462. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900011>
- Jia, Y.; Tong, Y. y Min, L., 2015. Significance of functional GRP78 polymorphisms in predicting the onset of type 2 diabetic peripheral neuropathy in Chinese population. *Neurological Research* [en línea], 37 (8), 683-687. Disponible en: <https://doi.org/10.1179/1743132815Y.0000000054>
- Küper, M. A.; Schüle, R.; Mayer, P.; Königsrainer, A. y Beckert, S., 2012. Factor XIII Val34Leu polymorphism is associated with increased factor XIII activation and decreased transcutaneous oxygen readings in patients with diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine* [en línea], 29 (12), 1596-1599. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03707.x>
- Li, Z.; Wang, Y.; Newton, I. P.; Zhang, L.; Ji, P. y Li, Z., 2015. GRP78 is implicated in the modulation of tumor aerobic glycolysis by promoting autophagic degradation of IKK $\beta$ . *Cellular Signalling* [en línea], 27 (6), 1237-1245. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.030>
- Mehmet, E.; Zuhail, E.; Mustafa, K.; Soner, S.; Aslı, T. y Sevki, C., 2016. The relationship of the apolipoprotein E gene polymorphism in Turkish Type 2 Diabetic Patients with and without diabetic foot ulcers. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* [en línea], 10 (1), S30-S33. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2015.09.006>
- Mir, K. A.; Pugazhendhi, S.; Paul, M. J.; Nair, A. y Ramakrishna, B. S., 2009. Heat-shock protein 70 gene polymorphism is associated with the severity of diabetic foot ulcer and the outcome of surgical treatment. *The British Journal of Surgery* [en línea], 96 (10), 1205-1209. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bjs.6689>

- Niu, Z.; Wang, M.; Zhou, L.; Yao, L.; Liao, Q. y Zhao, Y. (2015). Elevated GRP78 expression is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Scientific Reports* [en línea], 5, 1-12. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep16067>
- O'Connor, D. M. y Boulis, N. M. (2015). Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Trends. Molecular Medicine* [en línea], 21(8), 504-512. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.06.001>
- Pichu, S.; Sathiyamoorthy, J.; Krishnamoorthy, E.; Umapathy, D. y Viswanathan, V., 2015. Impact of the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) pro582ser polymorphism and its gene expression on diabetic foot ulcers. *Diabetes Research and Clinical Practice* [en línea], 109 (3), 533-540. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.05.014>
- Pichu, S.; Sathiyamoorthy, J.; Vimalraj, S.; Viswanathan, V. y Chatterjee, S., 2017. Impact of lysyl oxidase (G473A) polymorphism on diabetic foot ulcers. *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea], 103, 242-247. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.050>
- Rose John, S., 2012. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences* [en línea], 8 (9), 1237-1247. Disponible en: <https://doi.org/10.7150/ijbs.4989>
- Rosero, C. y Corredor, M., 2016. Polimorfismos en genes implicados en el desarrollo de cáncer gástrico: revisión A Review of Polymorphisms in Genes Involved in the Development of Gastric Cancer. *Rev Col Gastroenterol* [en línea], 31 (4), 391-402. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v31n4/v31n4a09.pdf>
- Sevilla, S. D., 2007. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia Cardiaca*, 2 (3), 111-114.
- Singh, K.; Agrawal, N. K.; Gupta, S. K. y Singh, K., 2013. A functional single nucleotide polymorphism -1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* K [en línea], 12(X), 199-204. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1534734613493289>
- Singh, K.; Singh, K.; Agrawal, N. K. y Gupta, S. K., 2013. Association of variant rs7903146 (C/T) single nucleotide polymorphism of TCF7L2 gene with impairment in wound healing among north indian type 2 diabetes population: A case-control study. *International Journal of Lower Extremity Wounds* [en línea], 12 (4), 310-315. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1534734613504435>

- Soroush, N.; Radfar, M.; Hamidi, A. K.; Abdollahi, M.; Qorbani, M.; Razi, F.; ... Amoli, M. M., 2017. Vitamin D receptor gene FokI variant in diabetic foot ulcer and its relation with oxidative stress. *Gene* [en línea], 599, 87-91. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.012>
- Stoian, A.; Bănescu, C.; Bălășa, R. I.; Moșeșoiu, A.; Stoian, M.; Moldovan, V. G.; ... Dobreanu, M., 2015. Influence of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms on type 2 diabetes mellitus and diabetic sensorimotor peripheral neuropathy risk. *Disease Markers* [en línea], 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2015/638693>
- Thameem, F.; Puppala, S.; Arar, N. H.; Stern, M. P.; Blangero, J.; Duggirala, R. y Abboud, H. E., 2008. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. *Diabetes y Vascular Disease Research : Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* [en línea], 5 (2), 109. Disponible en: <https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.018>
- Wifi, M. N. A.; Assem, M.; Elsherif, R. H.; El-Azab, H. A. F. y Saif, A., 2017. Toll-like receptors -2 and -9 (TLR2 and TLR9) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes and diabetic foot. *Medicine* [en línea], 96 (17), e6760. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006760>
- Wu, X.; Xu, W.; Feng, X.; He, Y.; Liu, X.; Gao, Y.; ... Ye, Z., 2015. TNF- $\alpha$  mediated inflammatory macrophage polarization contributes to the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis in mice. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* [en línea], 28 (3), 351-361. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/0394632015593228>
- Yazdanpanah, L.; Shahbazian, H.; Nazari, I.; Arti, H. R.; Ahmadi, F.; Mohammadianinejad, S. E.; ... Latifi, S. M., 2018. Prevalence and related risk factors of diabetic foot ulcer in Ahvaz, south west of Iran. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* [en línea]. 12 (4), 510-524. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.018>



# POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO ASOCIADOS CON EL TRATAMIENTO PARA CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES METASTÁSICO

*Raúl Gerardo Haro Díaz<sup>1</sup>\**

*Saúl Campos Gómez<sup>2</sup>*

*Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez<sup>1</sup>*

*Leobardo Manuel Gómez Oliván<sup>1</sup>*

El cáncer renal es más común en hombres de tercera edad en países desarrollados. Se han presentado problemas para el diagnóstico y tratamiento, fomentando la metástasis del padecimiento. El tratamiento está basado en inhibidores de tirosin quinasa y se han identificado polimorfismos genéticos asociados con la eficacia y seguridad del tratamiento. El hallazgo, reporte y consideración de ellos, fomentará su optimización, seguridad y costo. El objetivo de este capítulo fue hacer una revisión exhaustiva acerca de los polimorfismos de nucleótido único relacionados con el tratamiento de carcinoma de células renales metastásico, para establecer una correlación con la selección y eficacia del tratamiento. Los artículos revisados fueron estudios clínicos, de 2010 a 2018. La ubicación genética del polimorfismo se revisó con la herramienta *1000 genomes browser* de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, localizando el polimorfismo genético por el código rs. Los hallazgos demostraron que existe una asociación de polimorfismos genéticos con la susceptibilidad de desarrollar diferentes tipos de cáncer, así como probabilidad de presentar toxicidad ante el tratamiento. Con la revisión realizada se concluyó que el sunitinib es el tratamiento más empleado para cáncer renal metastásico, y la toxicidad cutánea como la más frecuente en los pacientes. Los polimorfismos fueron en el factor de crecimiento vascular endotelial y sus receptores, los cuales están asociados con el tratamiento de primera línea.

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* rharod625@alumno.uaemex.mx

<sup>2</sup> Centro Oncológico Estatal ISSEMyM

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) es una enfermedad cuya incidencia es mayor en países desarrollados; en Norteamérica y Europa occidental es más común que en África o la India. Simultáneamente, existe correlación con la edad y el sexo, es más frecuente en hombres de la tercera edad. Con el crecimiento poblacional y el avance del grupo etario, la incidencia al cáncer renal mostrará una tendencia creciente (Wong et al., 2017).

En 2008 este padecimiento cancerígeno fue el número 13 más común a nivel mundial. En 2012, para las mujeres fue el número 14 y para hombres la novena en incidencia, a nivel mundial fue la causa número 16 de muerte (Ferlay et al., 2015). En México, en 2012, ocupó la posición 14 en cuanto a mortalidad por cáncer, para las mujeres representó la decimocuarta causa de muerte por cáncer tras generar 811 muertes, y en hombres fue la octava, dejando 1 116 decesos (Sedano Basilio et al., 2016).

Se han encontrado factores de riesgo que aumentan las probabilidades de desarrollar CCR, como tabaquismo, obesidad, hipertensión arterial sistémica (HAS), así como el uso excesivo de analgésicos. Por otra parte, existen hábitos personales que disminuyen las probabilidades de desarrollarlo como el uso moderado de alcohol y una dieta rica en frutas y vegetales (Kabarria et al., 2016). Los avances científicos han permitido una clasificación de los subtipos de CCR asociada a las anormalidades genéticas (tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de subtipo histológico de carcinoma de células renales 2016 OMS**

<i>Subtipo histológico</i>	<i>Anormalidades en cromosoma</i>	<i>Anormalidades genéticas</i>
Células claras CCRcc	3p25-26 (34%-56%) de carcinomas esporádicos, 3p14.2 y en 3p12.	VHL
Papilar tipo I CCRp1	Trisomía o tetrasomía 7, trisomía 17 y pérdida del cromosoma Y	ac-MET
Papilar tipo II CCRp2	Trisomía o tetrasomía 7, trisomía 17 y pérdida del cromosoma Y	Fumarato-hidratasa
Cromóforo	Pérdida de cromosoma en 1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21.	Birt-Hogg-Dube
Carcinoma en conducto ductal CCRdc	Pérdida de cromosoma en 1q, 6p, 13q, 14, 15, 21q y 22.	

VHL; Von Hippel Lindau; Proteína tirosin quinasa MET.

Fuente: Escudier et al., 2012.

El sistema de estadificación de tumor, nódulo, metástasis (TNM) se usa para poder estadificar las variantes histológicas del CCR. Este sistema se basa en evaluar la extensión anatómica de la enfermedad y se ha demostrado que tiene correlación directa con el pronóstico. Esta revisión fue propuesta y apoyada en 2009 por el comité conjunto estadounidense sobre el cáncer, dicha evaluación se muestra en la tabla 2 (Escudier et al., 2012).

**Tabla 2. Estadificación por tumor, nódulo, metástasis**

<i>Tumor primario</i>	<i>Descripción</i>
TX	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	Sin evidencia de tumor primario
T1	Tumor $\leq 7$ cm, limitado al riñón
T1a	Tumor $\leq 4$ cm o menos, en gran dimensión, limitado al riñón
T1b	Tumor entre 4 a 7 cm, en gran dimensión, limitado al riñón
T2	Tumor mayor a 7cm, limitado al riñón
T2a	Tumor entre 7 a 10 cm en gran dimensión, limitado al riñón
T2b	Tumor mayor de 10 cm, limitado al riñón
T3	El tumor se extiende a las venas principales, tejido suprarrenal y perinéfrico, pero no se da más allá de las fascia de Gerota
T3a	El tumor invade el tejido periférico, seno renal o vena renal
T3b	El tumor se extiende a la(s) vena(s) renal(es) o a la vena cava por debajo del diafragma
T3c	El tumor se extiende a la vena cava por encima del diafragma o a la pared de la vena cava en cualquier nivel
T4	El tumor invade más allá de la fascia de Gerota o directamente en la glándula suprarrenal
N-	Nódulos linfáticos regionales
NX	Los nudos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis de ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en un único ganglio linfático regional
N2	Metástasis en más de un ganglio linfático regional
M-	Metástasis distante
MX	La metástasis distante no puede ser evaluada
M0	Sin metástasis distante
M1	Metástasis distante

Fuente: Escudier et al., 2012.

El sistema de estadificación comúnmente más utilizado varía en la etapa I-IV en función de la etapa anatómica, ubicando al paciente en un grupo de pronóstico, dicho sistema se muestra en tabla 3 (Motzer, 2011).

**Tabla 3. Sistema de estadificación anatómica y grupo de pronóstico**

<i>Estadio anatómico</i>	<i>Grupo pronóstico</i>
Estado I	T1, N0, M0
Estado II	T2, N0, M0
Estado III	T1 o T2, N1, M0 T3, N0 o N1, M0
Estado IV	T4, cualquier N, M0 cualquier T, cualquier N, M1 <sup>7</sup>

Fuente: Motzer, 2011.

### Tratamiento para el carcinoma de células renales metastásico

Cuando se tiene un tumor renal localizado una resección quirúrgica es la opción de tratamiento más recomendable, ya sea a través de una nefrectomía radical o por una cirugía ahorradora en nefronas. Cualquiera de las dos opciones está asociada con sus propios riesgos y beneficios, el balance entre ellos se encontrará al observar con el paso del tiempo la función renal y la supervivencia libre sin progresión (SLP) (Motzer, 2011).

Cuando la enfermedad está avanzada, la puntuación Motzer es un sistema estandarizado para calcular el pronóstico de la enfermedad, para lo cual los pacientes se evaluarán bajo los siguientes factores de riesgo:

- a) Estatus KRNAovsky (PS) < 80%
- b) Hemoglobina baja del límite.
- c) Tiempo entre el diagnóstico y tratamiento menor a un año.
- d) Calcio arriba del límite normal.
- e) Plaquetas arriba del límite normal.
- f) Neutrófilos arriba del límite.

Si el paciente no presenta ninguno de los factores mencionados previamente se encuentra en el grupo de pronóstico favorable, al tener entre uno y dos factores se ubica en pronóstico intermedio y cuando presenta tres o más está en el grupo de alto riesgo. En dichos grupos existen diferencias significativas en la supervivencia

promedio, 75, 53 y 7 meses respectivamente. Los pasos a seguir cuando se encuentra una enfermedad con metástasis son los siguientes:

- a) Manejo de enfermedad metastásica: el tratamiento sistémico cuando hay metástasis es el más utilizado en casos con histología de células claras; muchos estudios piloto se han basado ellos, ya que es el subtipo que más se ha hallado histológicamente, aunque las recomendaciones de tratamiento también dependerán del grado de riesgo que tenga el paciente.
- b) Primera línea de tratamiento en pacientes con buen o intermedio pronóstico: debido a que el CCR tiene un curso indolente, se sugiere primero tener una observación continua del paciente por un tiempo determinando para, después, poder otorgar el tratamiento correcto. En pacientes con buen o intermedio pronóstico se han probado tres medicamentos en estudios piloto fase III: Bevacizumab + interferón  $\alpha$ , sunitinib y pazopanib, sin embargo como tratamientos alternativos se encuentra la interleucina -2 y el sorafenib (figura 1).
- c) Primera línea de tratamiento en pacientes con bajo pronóstico: el temsirolimus fue la única droga que presentó evidencia de su actividad en estudios piloto, al tener mayor supervivencia libre de progresión que el interferón (figura 1).
- b) Segunda línea de tratamiento: en ésta el paso a seguir dependerá del tratamiento previo, para aquellos que recibieron al principio un fármaco que actuará sobre la vía factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el everolimus y el axitinib han demostrado eficacia. Aquellos a los que se les haya administrado citoquinas se recomienda inhibidores de tirosin-quinasa (TKIS), pues estudios recientes han mostrado su eficacia. Algunos medicamentos como sorafenib, pazopanib y recientemente el axitinib. Pero actualmente la dispensación de citoquinas ha disminuido, por lo cual son pocos los pacientes que usan estos medicamentos en segunda línea (Escudier et al., 2012).

Figura 1. Tratamiento de primera línea para CCRm



Fuente: Escudier et al., 2012.

## Polimorfismos de nucleótido único

La variedad genética surge debido a la mutación y es muy importante para la adaptabilidad y supervivencia de la especie. Dos *Homo sapiens* que no estén relacionados comparten el 99.5% de secuencia del ácido desoxirribonucleico (DNA). Las variantes en el resto de la secuencia que sea estable y se presente poco más del 1% de la población se denomina polimorfismo, y cuando la secuencia difiere de un solo

nucleótido se conoce como SNPs, por su significado en inglés Single Nucleotide Polymorphism, y tiene sus siglas rs cuando dicho polimorfismo es reconocido, catalogado y estadificado (Shaw, 2013).

Los SNPs son las variaciones genéticas más comunes. En diversos estudios se han demostrado la asociación entre estas alteraciones genéticas y la susceptibilidad de presentar enfermedades (Batnyam, 2013). Los SNPs y sus variables han sido localizadas en genes codificantes y no codificantes de proteínas en el desarrollo de enfermedades multifactoriales. La estructura, función o la actividad de proteínas o enzimas relacionadas a la respuesta de medicamentos se ven dañadas también por los SNPs (Ramírez Bello, 2017).

Los SNPs inducen cambios en la estructura secundaria del RNA (ácido ribonucleico), lo cual puede generar un impacto potencial en la expresión o función de un gen (Salari, 2013). La aplicación de los SNPs a los estudios genéticos continuará expandiéndose ya que son marcadores abundantes y codominantes que están ampliamente distribuidos en genomas, fáciles de puntuar y susceptibles de detección de alto rendimiento (Garvin, 2010).

Los SNPs han servido como marcadores genéticos para el diagnóstico, ya que permiten mostrar la resistencia o susceptibilidad probable de pacientes a enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus (Qi, 2017). Por lo que comprender el efecto biológico de los alelos de los SNPs, en diferentes genes que estén asociados a enfermedades permitirá definir su influencia en la susceptibilidad, la gravedad y la actividad de diferentes enfermedades crónicas, así como identificar la respuesta de las personas ante terapias específicas (Ramírez Bello, 2017).

El presente trabajo busca recolectar, analizar y asociar reportes y registros de SNPs relacionadas con el CCR metastásico (CCRM) y su tratamiento, para mejorar la selección del medicamento para paciente con CCRM de uso crónico y conocer la probabilidad de generar un efecto adverso al medicamento, fomentando así su calidad y cantidad de vida tras la asignación del tratamiento óptimo.

## METODOLOGÍA

### Selección de artículos científicos

Se realizó una investigación y documentación a través de la búsqueda electrónica de artículos científicos acerca de la relación de un polimorfismo genético con el tratamiento para CCRm y los factores que modifican los polimorfismos, como reacciones adversas a los medicamentos y su eficacia terapéutica, tomando en cuenta el sitio y la cantidad de pacientes inmersos en dichos documentos científicos.

Como criterios de inclusión se tomaron artículos publicados entre 2010 a 2018, en donde se menciona el polimorfismo a evaluar con el código rs y que este último esté relacionado con el CCRm, en cualquiera de sus clasificaciones. Se excluyeron aquellos sin dato del polimorfismo genético en que se hayan reportado a una enfermedad oncológica diferente a CCRm, así como aquellos estudios en donde los datos en menos de 50 pacientes evaluados.

### Fuente de datos

Los artículos revisados fueron estudios clínicos reportados entre 2010 a 2018, utilizando bases de datos o *journals* como *Elsevier*, *ScienceDirect*, *Nature*, entre otros. Se realizaron tablas 4 y 5, en donde se reportaron los datos del polimorfismo asociado, la ubicación genética del mismo, así como la respuesta del polimorfismo y su asociación con el tratamiento para CCRm.

Para encontrar la ubicación genética del polimorfismo se recurrió a revisar la herramienta *1000 genomes browser* de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, localizando el polimorfismo genético por el código rs. Cabe mencionar que los polimorfismos al ser evaluados en National Center for Biotechnology Information NCBI se reportaban con pares de bases nucleares diferentes a las que se mencionaron en los artículos revisados, es por ello que los resultados en la tabla 4 y 5 se describen las pares de bases nucleares de acuerdo a las reportadas en los artículos revisados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de los recientes avances en las bases morfológicas y terapéuticas del CCR, el pronóstico de la enfermedad y de su progresión está basado en los resultados clínicos y sanguíneos (Garrigós et al., 2017). Es por ello que en recientes años se ha empleado más el análisis farmacogenético en los pacientes, se ha encontrado en ellos SNPs asociados con variabilidad entre los pacientes en factores de eficacia al tratamiento: supervivencia general (SG), SLP, el rango de respuesta (RR) y media de tratamiento estable (MTE), la susceptibilidad que pueden tener para desarrollar un tumor renal y la toxicidad que presentan los medicamentos para el desarrollo de un efecto adverso. En la tabla 4 se muestran los polimorfismos asociados con la eficacia del tratamiento, referenciados en los artículos analizados.

Tabla 4. Polimorfismos asociados con la eficacia del tratamiento para CCR

<i>Gen y código rs</i>	<i>Localización y polimorfismo genético</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Fármaco elacionado</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Fuente de información</i>
VEGFR2, rs2071559	Chr4q12, A>G	España	Efecto protector y mayor SLP en pacientes con cáncer renal localizado	-----	99	Garrigós et al., 2017
PDGFRA rs2228230	Chr4q12 C>T	España	Menor SLP en pacientes con cáncer renal localizado	-----	99	
VEGFR2, rs10013228	Chr4q12, A>G	España	Menor SLP en pacientes con cáncer renal localizado	-----	99	
VEGFR3, rs307826	Chr5q31.5, T>C	España	Menor SG en pacientes con cáncer renal localizado	-----	99	
VEGFR3, rs6877011	Chr5q31.5, C>G	España	Menor SG en pacientes con cáncer renal localizado	-----	99	
PRKAR1B, rs9800958	Chr7p22, A>G	España	Mayor SG en pacientes con CCRM	Sunitinib, Pazopanib, Everolimus y Temsirolimus	99	

*Continúa...*

<i>Gen y código rs</i>	<i>Localización y polimorfismo genético</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Fármaco elacionado</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Fuente de información</i>
PDGFRB, rs2302273	Chr5q33.1, G>A	España	Mayor SG en pacientes con CCR m	Sunitninb, Pazopanib, Everolimus y Temsirolimus	99	
VEGF-C, rs2016110	Chr4q34, A>G	España	Mejor RR en pacientes con CCRm	Sunitninb, Pazopanib, Everolimus y Temsirolimus	99	
VEGF-B, rs594942	Chr11q13.1, T>C	España	Mejor RR en pacientes con CCRm	Sunitninb, Pazopanib, Everolimus y Temsirolimus	99	Garrigós et al., 2017
VEGF-A, rs699947	Chr6p21.1, A>C	España	Menor RR en pacientes con CCRm	Sunitninb, Pazopanib, Everolimus y Temsirolimus	99	
VEGF-A, rs3025010	Chr6p21.1, T>C	España	Menor RR en pacientes con CCRm	Sunitninb, Pazopanib, Everolimus y Temsirolimus	99	
IL-8, rs1126647	Chr4q21.1, A>T	Estudios clínicos: COMPARZ, VEG105192, VEG107769	TT se asocia con SG en CCRm	Sunitinib y Pazopanib	1059	
IL-8, rs4073	Chr4q21.1, T>A	Estudios clínicos: COMPARZ, VEG105192, VEG107769	TT aumenta riesgo ante CCRm	Sunitinib y Pazopanib	1059	C. F. Xu et al., 2015
PTGS2, rs5275	Chr1q31, T>C	España	Disminuye SLP y SEC en pacientes con CCRm	Sunitinib	82	
PIK3CA, rs7651265	Chr3q26.2, A>G	España	Disminuye SLP en pacientes con CCRm	Sunitinib	82	Cebrián et al., 2017
IL-4, rs2243250	Chr5q31.1, C>T	España	Disminuye SEC en pacientes con CCRm	Sunitinib	82	

*Continúa...*

<i>Gen y código rs</i>	<i>Localización y polimorfismo genético</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Fármaco elacionado</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Fuente de información</i>
VEGFR2, rs1870377	Chr4q12, A>T	China	TT mayor SG que AA	Sunitinib	68	Liu et al., 2017
VEGFR3, rs448012	Chr5q35.1, C>G	China	GG mayor SG que CC	Sunitinib	68	
VEGFA, rs833061	Chr6p21.1, C>T	Italia	TT mayor SG que CC	Sunitinib	84	Scartozzi et al., 2013
VEGFA, rs2010963	Chr6p21.1, G>C	Italia	GG mayor SG que CC	Sunitinib	84	
FLT4, rs6877011	Chr5q35.1, C>G	Italia	CC mayor SG que GG	Sunitinib	84	
miR-34b/c, rs4938723	Chr11q23.1, T>C	China	CC aumenta riesgo	Sunitinib	710	S. Zhang, 2014
STAT3, rs4796793	Chr17q21.2, C>G	Japón	Es un biomarcador que predice la respuesta al tratamiento	IFN- $\alpha$	203	Eto et al., 2013
VEGFR2, rs2239702	Chr4q12, C>A	China	GG muestra mayor SG, MTS y SLP ante CCRm	Sorafenib	107	Qin et al., 2016
VEGFA, rs1570360	Chr6p21.1, A>G	China	GG mayor SLP ante CCRm	Sorafenib	107	
IL-8, rs1126647	Chr4q21.1, A>T	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a SLP, AA>TT	Pazopanib	728	Chun Fang et al., 2011
IL-8, rs4073	Chr4q21.1, T>A	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a SLP, AA>TT	Pazopanib	728	
HIF1A, rs11549467	Chr14q23, G>A	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a SLP y RR, GG>GC	Pazopanib	728	
NR1I, rs3814055	Chr3q13.3, C>T	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a RR, CC>GG	Pazopanib	728	

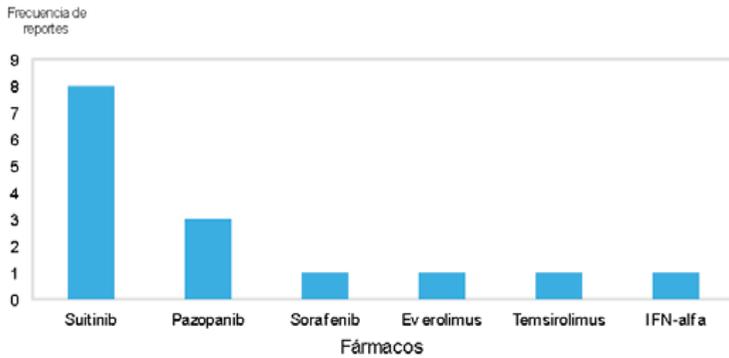
*Continúa...*

<i>Gen y código rs</i>	<i>Localización y polimorfismo genético</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Fármaco elacionado</i>	<i>Paciente</i>	<i>Fuente de información</i>
VEGFA, rs699947	Chr6p21.1, A>C	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a RR, AA>TT	Pazopanib	728	
VEGFA, rs833061	Chr6p21.1, C>T	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a RR, CC>GG	Pazopanib	728	Chun Fang et al., 2011
VEGFA, rs2010963	Chr6p21.1, G>C	Estudios clínicos: VEG102616, VEG105192 y VEG107769	Asociación a RR, CC>GG	Pazopanib	728	
VEGFR1, rs9582036	Chr13q12.2, A>C	Francia, Bélgica	Homocigoto CC menor SG y TPP	Sunitinib	91	Beuselinck et al., 2014
VEGFR1, rs9554320	Chr13q12.2, C>A	Francia, Bélgica	Homocigoto AA menor SG y TPP	Sunitinib	91	
VEGFR3, rs307826	Chr5q35.1, A>G	España	Homocigoto AA muestra mayor SLP que AG	Sunitinib	89	García Donas et al., 2011
VEGFR3, rs307821	Chr5q35.1, G>T	España	Homocigoto GG muestra mayor SLP que GT	Sunitinib	89	
rs20541	G>A	China	Se asocia a reducir la susceptibilidad a CCR	-----	277	H.-L. Zhang et al., 2007

MTS, mediana del tiempo para progression. RR, Rango de respuesta, SEC, supervivencia específica al cancer. SG, supervivencia general. SLP, supervivencia libre sin progression. TPP, Tiempo para progresión. Elaboración propia

En este caso se encontraron 19 genes, 30 polimorfismos y seis medicamentos involucrados en la efectividad del tratamiento para cáncer renal, en donde la mayoría de los genes evaluados fueron de la familia VEGF, tanto los ligandos como los receptores. Así como en los medicamentos a evaluar el sunitinib representó la mayoría de los reportes asociados a la eficacia del tratamiento (figura 2).

Figura 2. Fármacos reportados con la asociación de SNP a la eficacia del tratamiento en pacientes con CCRM

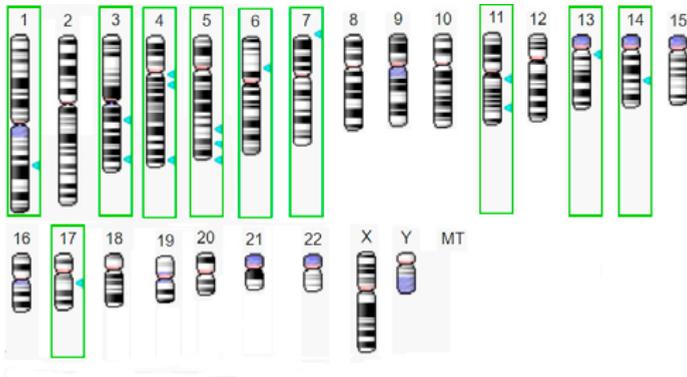


Elaboración propia.

Se sumaron un total de 3 597 pacientes de nueve países o estudios clínicos, siendo estos últimos los que más pacientes incluyeron en sus estudios de eficacia y fue el pazopanib el medicamento que más pacientes evaluó en los estudios clínicos VEG105192 y VEG107769. Por otra parte, fue en China donde más se analizó la eficacia para cáncer renal metastásico, con cuatro artículos publicados.

En la figura 3 se muestra la ubicación cromosómica de los polimorfismos encontrados en relación con la eficacia del tratamiento para cáncer renal metastásico.

Figura 3. Localización cromosómica de los SNPs asociados a la eficacia del tratamiento contra CCRM



Elaboración propia.

Posteriormente se analizaron los artículos relacionados con la toxicidad del tratamiento para CCRM, en la tabla 5 se muestran los polimorfismos encontrados en 1345 pacientes en China, Japón, España, Países Bajos, Estados Unidos y estudios clínicos.

**Tabla 5. Polimorfismos asociados con la toxicidad del tratamiento para CCR**

<i>Gen y códigos rs</i>	<i>Localización y Polimorfismo genético</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Fármaco relacionado</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Fuente de información</i>
VEGFA , rs2010963	Chr6p21.1, G>C	China	El SNP mostró asociación a padecer síndrome mano-pie	Sorafenib	107	Qin et al., 2016
ACBC1, rs1045642	Chr7q21.1, A>G	China	El SNP mostró asociación a HAS	Sorafenib	107	
ABCC2, rs2002042	Chr10q24.3, C>T	Japón	Aumento de HGSR en mujeres con CCR	Sorafenib	55	Tsuchiya et al., 2013
UGT1A1, rs8175347	Ch2q37.1, T>G	Pacientes del estudio VEG102616 y VEG105192	Induce al desarrollo de HGSR en pacientes con CCR	Pazopanib	236	
UGT1A1, rs4148323	Ch2q37.1, T>G	Pacientes del estudio VEG102616 y VEG105192	Induce al desarrollo de HGSR en pacientes con CCR	Pazopanib	236	Xu et al., 2010
CYP1A2, rs762551	Chr15q24, C>A	Pacientes del estudio VEG102616 y VEG105192	Induce al desarrollo de HGSR en pacientes con CCR	Pazopanib	236	
UGT1A1, rs8175347	Ch2q37.153, TA6>TA7	Países bajos	Aumento de niveles de bilirrubina	Sorafenib	114	
OATP1B1, rs2306283	Chr12p12.1, A>G	Países bajos	Aumenta probabilidades de diarrea	Sorafenib	114	Slcob, 2016
OATP1B1, rs4149056	Chr12p12.1, T>C	Países bajos	Aumenta probabilidades de trombocitopenia	Sorafenib	114	
IL8, rs1126647	Chr4q21.1, A>T	Estudios SUTOS, SOGUG y CCF	El alelo T se asocia a mayor probabilidad de hipertensión	Sunitinib	336	Diekstra et al., 2015

*Continúa...*

<i>Gen y código rs</i>	<i>Localización y Polimorfismo genético</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Fármaco relacionado</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Fuente de información</i>	
IL13, rs1800925	Chr5q31.1, C>T	Estudios clínicos SUTOS, SOGUG y CCF	El alelo T mostró asociarse a leucopenia y toxicidad mayor a grado 2	Sunitinib	336	Diekstra et al., 2015	
HFE, rs2858996	Chr6p22.2, G>T	Estudios clínicos VEG102616, VEG105192	Polimorfismo TT se asocia a elevación de ALT	Pazopanib	243	Chun Fand et al., 2011	
HFE, rs707889	Chr6p22.2, G>T	Estudios clínicos VEG102616, VEG105192	Polimorfismo TT se asocia a elevación de ALT	Pazopanib	243		
CYP3A5, rs776746	Chr7q22, G>A	España	Asociado con toxicidad y reducción de dosis	Sunitinib	95	Garcia Donas et al., 2011	
VEGFR2, rs1870377	Chr4q12, T>A	España	Asociado a hipertensión	Sunitinib	95		
VEGF-A, rs699947	Chr6q21.1, A>C	España	Asociado a hipertensión	Sunitinib	95		
VEGF-A, rs1570360	Chr6q21.1, G>A	España	Asociado a hipertensión	Sunitinib	95		
ABCB1, rs1128503	Chr7q21.1, C>T	España	Protección ante hipertensión	Sunitinib	95		
ABCB1, rs2032582	Chr7q21.1, G>T	España	Protección ante hipertensión	Sunitinib	95		
VEGFR2, rs2305948	Chr4q12, C>T	España	Asociado a síndrome mano-pie	Sunitinib	95		
VEGF-A, rs2010963	Chr6p21.1, G>C	España	Protección ante mucositis	Sunitinib	95		
CYP3A4, rs4646437	Chr7q22, G>A	Estados Unidos de América	Heterocitogo AG mostró tener menor riesgo a EA>grado 3	Sunitinib	159		De Velasco et al., 2016

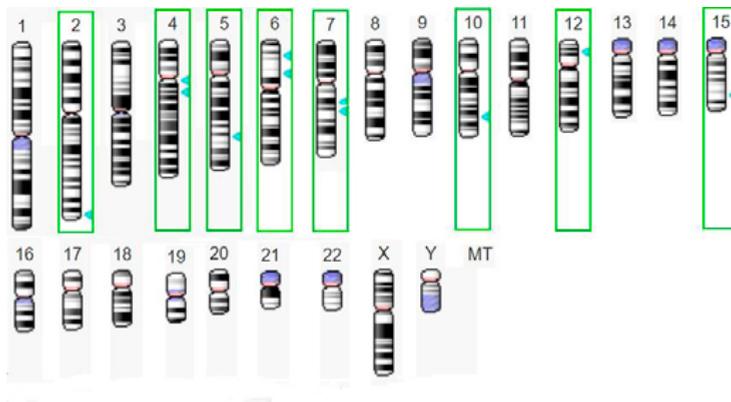
HAS, hipertensión arterial sistémica. HGSR, rash cutáneo de alto grado. Elaboración propia.

Para la toxicidad al tratamiento se encontraron 20 SNPs de 12 genes diferentes, siendo el VEGFA el que presentó mayor frecuencia. En donde la mayoría de las toxicidades

reportadas fueron eventos adversos dérmicos, como síndrome mano-pie o HGSR, sin embargo, la hipertensión arterial fue la que se mencionó más.

En el reporte de toxicidad sólo se encontraron los TKIS mencionados en los artículos, sorafenib y pazopanib dos veces, y sunitinib tres veces, la ubicación cromosómica de los SNPs asociados con la toxicidad bajo tratamiento contra cáncer renal metastásico se muestra en la figura 4.

**Figura 4. Localización cromosómica de los SNPs asociados a la toxicidad del tratamiento contra CCRm**



Elaboración propia.

A través del tiempo el diagnóstico del cáncer ha sufrido cambios, ya no sólo se basa en los parámetros morfológicos, cada vez más se encuentran diagnósticos respaldados por alteraciones inmunohistoquímicas y moleculares en del DNA a nivel proteómico. Por ello es que hay un impacto significativo en la medicina, buscando un enfoque personalizado, basado en la precisión brindada por la farmacogenómica (Sethi, 2013).

El rol del citocromo en la activación o inactivación de la precarcinogénesis, así como los medicamentos que se usan contra el cáncer, es de suma importancia, y la variabilidad interindividual en la eficacia y toxicidad del tratamiento farmacéutico se asocia con polimorfismos en genes respectivos al metabolismo, transporte y efecto farmacéutico (Majumder, 2017).

La farmacogenómica ha aportado un impacto significativo sobre el tratamiento para el cáncer, pero la implementación difiere entre los marcadores somáticos y

germinales (Filipski, 2014). Al ampliar la comprensión del genoma se revelarán asociaciones genómicas de la línea germinal con resultados clínicamente relevantes, específicamente, con respecto a la toxicidad que induce el tratamiento (Hertz, 2015).

A pesar de que existen factores como la dieta, edad, raza o trastornos metabólicos que influyen en la farmacogenética o farmacodinámica del tratamiento anticancerígeno, se han encontrado variaciones genéticas en las enzimas metabolizadoras de estos fármacos, los cuales han mostrado impactar en la variabilidad del tratamiento (Ieiri, 2012).

Los estudios farmacogenéticos para entender la respuesta al tratamiento oncológico se ha estado llevando a cabo en diversos tumores. En pacientes portuguesas con cáncer cervical se encontró la asociación del polimorfismo TP53 Arg72Pro (rs1042522), con el riesgo de muerte en los portadores de homocigoto (Coelho et al., 2018).

Para el cáncer pulmonar de células pequeñas se encontró asociación del polimorfismo en el gen XRCC1 con el rango de respuesta ante quimioterapia con platino (Li, 2014). En pacientes con cáncer de mama se descubrió la asociación de polimorfismos en UGT2B7 y CYP2D6 con los procesos farmacocinéticos de tamoxifen (Charoenchokthavee, 2017). En el cáncer de próstata se halló que polimorfismos genéticos en CYP19A1 se asociaban con la probabilidad de desarrollar el padecimiento: “we investigated the functions of CYP19A1 polymorphisms and their associations with prostate cancer risk and clinical outcome. This case-control study evaluated the effects of three single nucleotide polymorphisms (SNPs)” (Kanda et al., 2015).

Los factores genéticos y moleculares pueden jugar un papel importante en la susceptibilidad a la carcinogénesis de cada individuo y el desarrollo de la enfermedad (Malhotra, 2014). En los recientes años los avances en farmacogenética han permitido encontrar relación de SNPs con la respuesta al tratamiento, la optimización de la dosis y la relación con reacciones adversas de los medicamento (RAM) (Wei, 2012).

Se ha reportado asociación de alteraciones genéticas con correspondencia a la toxicidad de un medicamento. En un estudio se asoció el polimorfismo 677 C-T de metilentetrahidratofolato reductasa (MTHFR), con hemocisteína elevada en pacientes con cáncer de ovario bajo tratamiento con metotrexato (Toffoli et al., 2003).

En la India se encontró asociación de polimorfismos en CYP450, en pacientes con cáncer de mama y su relación con el tratamiento de ciclofosfamida. Se encontró correlación de CYP3A5\*3, CYP2C19\*2 y CYP2B6\*5 con anemia mayor a segundo

grado (Tulsyan, 2014). En pacientes con cáncer de cabeza y cuello se mostró relación de polimorfismos en CYP39A1 con toxicidad presente ante tratamiento de docetaxel, quimioterapia con platino y 5-Fluoroacilo (Melchardt et al., 2015).

Los polimorfismos genéticos influyen en la susceptibilidad a desarrollar cáncer, no obstante, comprender los mecanismos para que ello suceda es complejo, sólo se sabe que los SNPs modifican la estructura espacial en la célula, lo cual afecta la estabilidad del mRNA, la metilación y la expresión específica de los alelos (Deng, 2017).

La farmacogenómica tiene como objetivo reducir la toxicidad y mejorar los resultados clínicos en los pacientes. En el área farmacogenómica de cáncer dichos descubrimientos podrían arrojar asociación con respuesta farmacológica variable; así como, revelar genes y vías que puedan usarse para nuevas líneas terapéuticas (Wheeler, 2013).

Se espera que el área clínica de la medicina genómica proporcione herramientas apropiadas que mejoren los enfoques cotidianos, para estimar el riesgo/beneficio del tratamiento en pacientes con cáncer (Innocenti, 2012).

## CONCLUSIÓN

En esta revisión se encontró mayor reporte de toxicidad dérmica, con relación al sunitinib, asimismo que no hay asociación reportada de toxicidad o eficacia de tratamientos anti mTOR para cáncer renal con un polimorfismo de nucleótido simple. Los genes que más se encontraron asociados con el estudio fueron los del VEGF y sus receptores, ya que es ahí donde actúa la mayoría de medicamentos para cáncer renal metastásico.

De igual manera, se encontró mayor reporte de eficacia y toxicidad del tratamiento para cáncer renal en países asiáticos que en países del continente americano. En conclusión, los estudios farmacogenéticos analizados mostraron polimorfismos asociados con la toxicidad, así como, la eficacia de los tratamientos para cáncer renal metastásico, evidenciando al sunitinib como el más usado y que los polimorfismos en VEGF se ven asociados con la respuesta al tratamiento que tendrán los pacientes.

## REFERENCIAS

- Batnyam, N.; Gantulga, A. y Oh, S., 2013. An Efficient Classification for Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Dataset, *Computer and Information Science* [en línea], 493, 171-185. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-00804->
- Beuselinck, B.; Karadimou, A.; Lambrechts, D.; Claes, B.; Wolter, P.; Couchy, G.; ... Oudard, S., 2014. VEGFR1 single nucleotide polymorphisms associated with outcome in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib-a multicentric retrospective analysis. *Acta Oncologica* [en línea], 53 (1), 103-112. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/0284186X.2013.770600>
- Cebrián, A.; Gómez Del Pulgar, T.; Méndez Vidal, M. J.; González, M. L.; Lainez, N.; Castellano, D.; ... García Foncillas, J., 2017. Functional PTGS2 polymorphism-based models as novel predictive markers in metastatic renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib. *Scientific Reports* [en línea], 7 (January), 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep41371>
- Charoenchokthavee, W.; Areepium, N.; Panomvana, D. y Sriuranpong, V., 2017. Effects of CYP2D6 and CYP3A5 polymorphisms on tamoxifen and its metabolites in thai breast cancer patients. *Breast Cancer: Targets and Therapy* [en línea], 9, 249-256. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S125745>
- Coelho, A. N. A.; Nogueira, A.; Soares, S.; Assis, J.; Pereira, D.; Bravo, I.; ... Medeiros, R. U. I., 2018. TP53 Arg72Pro polymorphism is associated with increased overall survival but not response to therapy in Portuguese/Caucasian patients with advanced cervical cancer, *Science* [en línea], 8165-8171. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8354>
- De Velasco, G.; Gray, K. P.; Hamieh, L.; Urun, Y.; Carol, H. A.; Fay, A. P.; ... Choueiri, T. K., 2016. Pharmacogenomic Markers of Targeted Therapy Toxicity in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *European Urology Focus Science* [en línea], 2 (6), 633-639. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2016.03.017>
- Deng, N.; Zhou, H.; Fan, H. y Yuan, Y., 2017. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget Science* [en línea], 8 (66), 110635-110649. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22372>

- Diekstra, M. H. M.; Liu, X.; Swen, J. J.; Boven, E.; Castellano, D.; Gelderblom, H.; ... Guchelaar, H. J., 2015. Association of single nucleotide polymorphisms in IL8 and IL13 with sunitinib-induced toxicity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *European Journal of Clinical Pharmacology Science* [en línea], 71 (12), 1477-1484. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00228-015-1935-7>
- Escudier, B.; Porta, C.; Schmidinger, M.; Algaba, F.; Patard, J. J.; Khoo, V.; ... Horwich, A., 2014. Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology Science* [en línea], 25 (3), iii49-iii56. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu259>
- Eto, M.; Kamba, T.; Miyake, H.; Fujisawa, M.; Kamai, T.; Uemura, H.; ... Naito, S., 2013. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon- $\alpha$  Therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *European Urology Science* [en línea], 63 (4), 745-752. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.09.052>
- Ferlay, J.; Shin, H. R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C. y Parkin, D. M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer Science* [en línea], 127 (12), 2893-2917. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; ... Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer Science* [en línea], 136 (5), E359-E386. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Filipski, K. K.; Mechanic, L. E.; Long, R. y Freedman, A. N., 2014. Pharmacogenomics in oncology care. *Frontiers in Genetics Science* [en línea], 5 (APR), 1-5. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00073>
- Garcia Donas, J.; Esteban, E.; Leandro García, L. J.; Castellano, D. E.; Del Alba, A. G.; Climent, M. A.; ... Rodríguez Antona, C., 2011. Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: A multicentre, observational, prospective study. *The Lancet Oncology Science* [en línea], 12 (12), 1143-1150. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70266-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70266-2)
- Garrigós, C.; Espinosa, M.; Salinas, A.; Osman, I.; Medina, R.; Taron, M.; ... Duran, I., 2017. Single nucleotide polymorphisms as prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma. *Oncotarget Science* [en línea], 8 (63), 106551-106564. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22533>

- Garvin, M. R.; Saitoh, K. y Gharrett, A. J., 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: A technical review. *Molecular Ecology Resources Science* [en línea], 10 (6), 915-934. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02891.x>
- Hertz, D. L. y Rae, J., 2015. Pharmacogenetics of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine Science* [en línea], 66 (1), 65-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-053013-053944>
- Ieiri, I., 2012. Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics Science* [en línea], 27 (1), 85-105. Disponible en: <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-11-RV-098>
- Innocenti, F.; Cox, N. J. y Dolan, M. E., 2012. Use of genomic information to optimize cancer chemotherapy. *Semin Oncol Science* [en línea], 38 (2), 186-195. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2011.01.005>.Use
- Kabaria, R.; Klaassen, Z. y Terris, M. K., 2016. Renal cell carcinoma: Links and risks. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease Science* [en línea], 9, 45-52. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S75916>
- Kanda, S.; Tsuchiya, N.; Narita, S.; Inoue, T.; Huang, M.; Chiba, S.; ... Habuchi, T., 2015. Effects of functional genetic polymorphisms in the CYP19A1 gene on prostate cancer risk and survival. *International Journal of Cancer Science* [en línea], 136 (1), 74-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ijc.28952>
- Li, L.; Wan, C. y Wen, F. Q., 2014. Polymorphisms in the XRCC1 gene are associated with treatment response to platinum chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients based on meta-analysis. *Genetics and Molecular Research Science* [en línea], 13 (2), 3772-3786. Disponible en: <https://doi.org/10.4238/2014.May.16.1>
- Liu, R.; Wang, X.; Li, W.; Shou, T.; Zhou, L.; Li, Y.; ... Pei, Q., 2017. Influence of VEGFR single nucleotide polymorphisms on the efficacy of sunitinib therapy against renal cell carcinoma. *Oncology Letters Science* [en línea], 13 (1), 201-205. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5396>
- Majumder, T.; Sajid, I.; Arif Md, H. y Alam, Z., 2017. Role of Cytochrome P450 Polymorphisms on Breast Cancer Treatment. *Vitamins y Minerals Science* [en línea], 6 (2), 2-5. Disponible en: <https://doi.org/10.4172/2376-1318.1000157>

- Malhotra, J., 2014. Molecular and genetic epidemiology of cancer in low- and medium-income countries. *Annals of Global Health Science* [en línea], 80 (5), 418-425. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.011>
- Melchardt, T.; Hufnagl, C.; Magnes, T.; Weiss, L.; Hutarew, G.; Neureiter, D.; ... Egle, A., 2015. CYP39A1 polymorphism is associated with toxicity during intensive induction chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *BMC Cancer Science* [en línea], 15 (1), 1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1776-x>
- Motzer, R. J.; Agarwal, N.; Beard, C. y Bahayani, S., 2011. NCCN clinical practice guidelines in oncology: kidney cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network Science* [en línea], 9 (July 2009). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5547-8\\_39](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5547-8_39)
- Qi, L. L.; Talukder, Z. I.; Hulke, B. S. y Foley, M. E., 2017. Development and dissection of diagnostic SNP markers for the downy mildew resistance genes Pl Arg and Pl 8 and maker-assisted gene pyramiding in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Genetics and Genomics Science* [en línea], 292 (3), 551-563. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1290-8>
- Qin, C.; Cao, Q.; Li, P.; Wang, S.; Wang, J.; Wang, M.; ... Yin, C., 2016. The influence of genetic variants of sorafenib on clinical outcomes and toxic effects in patients with advanced renal cell carcinoma. *Scientific Reports Science* [en línea], 6 (1), 1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep20089>
- Ramírez Bello, J. y Jiménez Morales, M., 2017. Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. *Gaceta Medica de Mexico*, 153 (2), 238-250.
- Salari, R.; Kimchi Sarfaty, C.; Gottesman, M. M. y Przytycka, T. M., 2013. Sensitive measurement of single-nucleotide polymorphism-induced changes of RNA conformation: Application to disease studies. *Nucleic Acids Research Science* [en línea], 41 (1), 44-53. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1009>
- Scartozzi, M.; Bianconi, M.; Faloppi, L.; Loretelli, C.; Bittoni, A.; Del Prete, M.; ... Cascinu, S., 2013. VEGF and VEGFR polymorphisms affect clinical outcome in advanced renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib. *British Journal of Cancer Science* [en línea], 108 (5), 1126-1132. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.501>

- Sedano Basilio, J. E.; Mayorga-Gómez, E.; Garza-Sainz, G.; Cornejo Dávila, V.; Uberetagoyna Tello de Meneses, I.; Palmeros Rodríguez, A. M.; ... Pacheco Gahbler, C., 2016. Epidemiología de los tumores genitourinarios en una década. *Revista Mexicana de Urología Science* [en línea], 76 (3), 131-140. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.uromx.2016.01.004>
- Sethi, S.; Ali, S.; Philip, P. A. y Sarkar, F. H., 2013. Clinical advances in molecular biomarkers for cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences Science* [en línea], 14 (7), 14771-14784. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms140714771>
- Shaw, G., 2013. Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *BJU International Science* [en línea], 112 (5), 664-665. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/bju.12298>
- Slcob, P., 2016. Polymorphisms in SLCO1B1 and UGT1A1 are associated with sorafenib-induced toxicity. *Pharmacogenomics Science* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/doi:10.2217/pgs-2016-0063>
- Toffoli, G.; Russo, A.; Innocenti, F.; Corona, G.; Tumolo, S.; Sartor, F.; ... Boiocchi, M., 2003. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer Science* [en línea], 103 (3), 294-299. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ijc.10847>
- Tsuchiya, N.; Narita, S.; Inoue, T.; Hasunuma, N.; Numakura, K.; Horikawa, Y.; ... Habuchi, T., 2013. Risk factors for sorafenib-induced high-grade skin rash in Japanese patients with advanced renal cell carcinoma. *Anti-Cancer Drugs Science* [en línea], 24 (3), 310-314. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32835c401c>
- Tulsyan, S.; Agarwal, G.; Lal, P. y Mittal, B., 2014. Significant role of CYP450 genetic variants in cyclophosphamide based breast cancer treatment outcomes: A multi-analytical strategy. *Clinica Chimica Acta Science* [en línea], 434, 21-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.009>
- Wei, C. Y.; Michael lee, M. T. y Chen, Y. T., 2012. Pharmacogenomics of adverse drug reactions: Implementing personalized medicine. *Human Molecular Genetics Science* [en línea], 21 (R1), 58-65. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/hmg/dds341>
- Wheeler, H. E.; Maitland, M. L.; Dolan, M. E.; Cox, N. J. y Ratain, M. J., 2013. Cancer pharmacogenomics: Strategies and challenges. *Nature Reviews Genetics Science* [en línea], 14 (1), 23-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrg3352>

- Wong, M. C. S.; Goggins, W. B.; Yip, B. H. K.; Fung, F. D. H.; Leung, C.; Fang, Y.; ... Ng, C. F., 2017. Incidence and mortality of kidney cancer: temporal patterns and global trends in 39 countries. *Scientific Reports Science* [en línea], 7 (1), 15698. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15922-4>
- Xu, C. F.; Bing, N. X.; Ball, H. A.; Rajagopalan, D.; Sternberg, C. N.; Hutson, T. E.; ... Pandite, L. N., 2011. Pazopanib efficacy in renal cell carcinoma: Evidence for predictive genetic markers in angiogenesis-related and exposure-related genes. *Journal of Clinical Oncology* [en línea], 29 (18), 2557-2564. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.9110>
- Xu, C. F.; Johnson, T.; Garcia Donas, J.; Choueiri, T. K.; Sternberg, C. N.; Davis, I. D.; ... Motzer, R. J., 2015. IL8 polymorphisms and overall survival in pazopanib- or sunitinib-treated patients with renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* [en línea], 112(7), 1190-1198. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.64>
- Xu, C. F.; Reck, B. H.; Xue, Z.; Huang, L.; Baker, K. L.; Chen, M.; ... Pandite, L., 2010. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *British Journal of Cancer* [en línea], 102 (9), 1371-1377. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605653>
- Zhang, H. L.; Sheng, X. N.; Li, X. S.; Wang, H. K.; Chi, Z. H.; He, Z. S.; ... Guo, J., 2017. Sorafenib versus sunitinib as first-line treatment agents in Chinese patients with metastatic renal cell carcinoma: the largest multicenter retrospective analysis of survival and prognostic factors. *BMC Cancer* [en línea], 17 (1), 16. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12885-016-3016-4>
- Zhang, S.; Qian, J.; Cao, Q.; Li, P.; Wang, M.; Wang, J.; ... Yin, C., 2014. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with renal cell cancer risk in a Chinese population. *Mutagenesis* [en línea], 29 (2), 149-154. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/geu001>

# ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

*Rodolfo López Linares<sup>1\*</sup>*

*Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez<sup>1</sup>*

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer que afecta a las mujeres a nivel mundial y analizar los efectos que se presentan en los cambios en la expresión génica de las líneas celulares de éste puede resultar en la localización de vías que permitan desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra esta patología. El objetivo es describir la metodología para analizar la expresión génica de genes y proteínas relacionadas con el cáncer de mama.

En el panel de líneas celulares se incluyen la línea celular MCF 7, la MDA MB 231 y la HCC 1937, cada una con diferencias genéticas y fenotípicas que permiten evaluar múltiples posibilidades de vías de señalización, genes y proteínas relacionadas con las características oncogénicas de cada línea celular.

Entre las técnicas descritas en este capítulo se incluyen el cultivo celular, la extracción de RNA, síntesis de cDNA, PCR en punto final, PCR en tiempo real, ELISA y Western Blot, las cuáles permitirán evaluar la expresión génica a nivel genético y proteómico.

Es de gran importancia tener disponibles las metodologías estandarizadas para el análisis de expresión génica en líneas celulares de cáncer de mama, como se demostrará enseguida.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer que afecta a las mujeres a nivel mundial (Espíe, Hamy, Eskenazy, Cuvier y Giacchetti, 2013). Es una patología que conlleva a un crecimiento anormal y descontrolado de las células que componen a la

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* rodolfo\_lopez10@hotmail.com

glándula mamaria; la cual está constituida por tres tipos de células: las mioepiteliales, de epitelio ductal y epitelio alveolar. Existen distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mamá, los cuales corresponden con la variabilidad en los patrones de expresión de ciertos receptores presentes en las células cancerosas, estos subtipos al luminal A y B (expresan el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona), el HER2 (expresa el factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2) y triple marcador negativo (no expresan receptores, muestran mayor nivel de proliferación y se les considera de alto riesgo (Santillán Benítez, Quiroz Ordóñez, Mendieta Zerón Gómez Oliván, 2015).

### Líneas celulares de cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, ya que este tipo de tumores muestran patrones recurrentes de anomalías transcripcionales, genómicas y biológicas. Al comprender cómo los genes en estos patrones funcionan colectivamente en un entorno biológico heterogéneo, permite evaluar la progresión y modular la respuesta a la terapia, lo cual es fundamental para mejorar el manejo de la enfermedad (Neve et al., 2009).

Una alternativa para evaluar la respuesta de las células cancerosas es la utilización de líneas celulares, éstas son definidas como un conjunto de células de un tipo único que se pueden mantener en cultivo *in vitro*. Existen distintos tipos de líneas, entre ellas se encuentran las continuas o inmortales, que se caracterizan por proliferar indefinidamente y normalmente presentan alteraciones citomorfológicas, sus características son tamaño celular menor, menor adherencia, más redondeadas, mayor relación núcleo/citoplasma y sobre todo un incremento en la tasa de proliferación celular, una reducción del tiempo de duplicación, menor dependencia de suero en el medio de cultivo y mayor facilidad para crecer en suspensión (Martínez Carpio y Navarro Moreno, 2003).

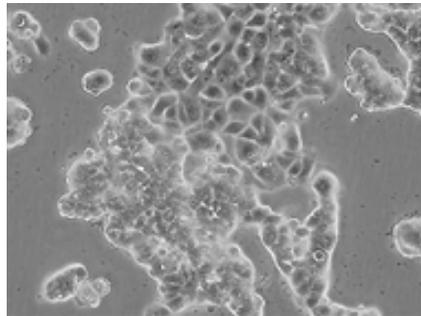
Sin embargo, siempre se debe considerar que las interrelaciones complejas que existen entre las células *in vivo* se pierden cuando las líneas celulares se cultivan *in vitro*. Además, las líneas celulares a menudo son sensibles a las condiciones de cultivo, en particular la inclusión de factores de crecimiento que a veces pueden alterar el fenotipo celular, lo que resulta en una activación o diferenciación inadecuada de la vía (Holliday y Speirs, 2011).

## Línea celular MCF 7

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se obtuvo originalmente en la Michigan Cancer Foundation a partir de un derrame pleural maligno de una mujer posmenopáusica con cáncer de mama metastásico que había sido tratada previamente con radioterapia y manipulación hormonal. Las células expresan receptores y con ello respuestas biológicas a una gran variedad de hormonas que incluyen: estrógeno, andrógeno, progesterona, glucocorticoides, insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, prolactina y hormona tiroidea, lo que le permite ser ampliamente utilizada para estudios de biología del cáncer de mama y mecanismos de acción hormonal (Osborne Trent y Hobbs, 1987) MCF-7, MCF-7 (KO).

Las células MCF-7 muestran muchas características de las células epiteliales mamarias normales, incluida la capacidad de generar agregados 3D multicelulares que pueden madurar y convertirse en esferoides que contienen lumen. Los esferoides del linaje MCF-7 se describen como una masa de células con núcleos desorganizados y fuertes enlaces célula a célula. Éstas se utilizan comúnmente en la investigación para experimentos con células de cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo, además son muy adecuadas para los estudios de resistencia a la terapia antihormonal, ya que son fáciles de cultivar y retienen la expresión del receptor de estrógeno cuando fueron tratadas con dicha terapia dirigida (Comsa, Cimpean y Raica, 2015).

Figura 1. Morfología de la línea celular MCF 7



Fuente: <http://www.atcc.org>

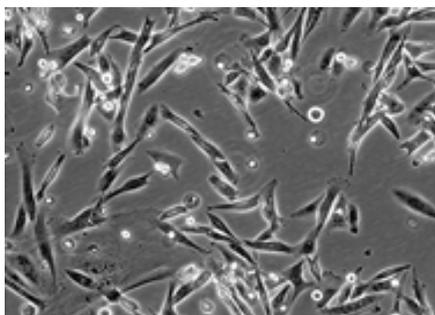
## Línea celular MDA MB 231

La línea celular MDA-MB-231 es epitelial de cáncer de mama humano, que se estableció a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico. Es una línea celular de cáncer de mama triple marcador negativo, altamente agresiva, invasiva y poco diferenciada, ya que carece de la expresión del receptor de estrógeno (ER), del receptor de progesterona (PR), y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo dos (HER2) (ATCC, HTB26).

En esta línea se ha comprobado una altísima actividad transcripcional tanto para diversos factores de crecimiento como para sus receptores, lo que hace pensar que el crecimiento rápido y autónomo que presentan se debe en gran medida a mecanismos autocrinos (Martínez Carpio y Navarro Moreno, 2003).

El cáncer de mama triple negativo es una forma agresiva de cáncer con opciones de tratamiento limitadas. Por lo tanto, comprender la base molecular de éste es crucial para el desarrollo efectivo de nuevas terapias contra estos tipos de cáncer de mama; como resultado, se han realizado muchos estudios sobre agentes potencialmente activos para este tipo particular de cáncer utilizando la línea celular MDA-MB-231 (ECACC, 2017).

**Figura 2. Morfología de la línea celular MDA MB 231**



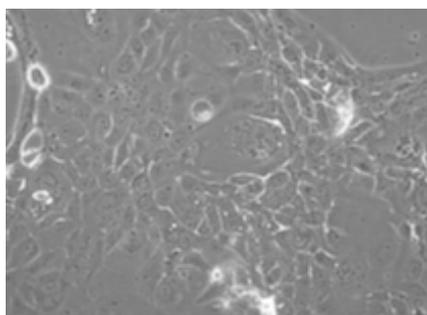
Fuente: <http://www.atcc.org>

## Línea celular HCC 1937

La línea celular HCC1937 (Hamon Cancer Center), se estableció a partir de un tumor de cáncer de mama primario ductal infiltrante de grado III de una paciente de 24 años de edad con una mutación de línea germinal BRCA1. Estas células tumorales crecen como una monocapa adherente y presentan vacuolas (Tomlinson et al., 1998).

Esta línea celular se describe como triple marcador negativo, ya que carece de la expresión del ER, del PR y del HER2, adicionalmente esta línea celular presenta una mutación adquirida de TP53 con pérdida de alelo de tipo salvaje, una eliminación homocigótica adquirida del gen PTEN y pérdida de heterocigosidad en múltiples loci que se sabe están implicados en la patogénesis del cáncer de mama (ATCC CRL2336, 1997).

Figura 3. Morfología de la línea celular HCC 1937



Fuente: <http://www.atcc.org>

## METODOLOGÍA

### Cultivo celular

La proliferación de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC) se debe llevar a cabo en cajas para cultivo celular, en el caso de estas líneas celulares se recomienda utilizar cajas de cultivo p60, ya que en esta dimensión de la caja se alcanza la confluencia necesaria para llevar a cabo la correcta mantención de las líneas celulares.

Las células se deben incubar a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, empleando el medio de cultivo RPMI 1640 (RPMI Medium 1640, Gibco Thermo Fisher Scientific; USA) suplementado al 10% de suero fetal bovino inactivado con calor (Fetal Bovine Serum, certified, US origin, Gibco Thermo Fisher Scientific, USA) y como antibiótico se recomienda emplear el 1% de penicilina-estreptomomicina (10 000 unidades de penicilina/10 mg/ml de estreptomomicina).

Adicionalmente para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231 se sugiere suplementar el medio de cultivo con una concentración 2 mM de piruvato y para la línea HCC 1937 se recomienda una concentración 2 mM de glutamina.

**Tabla 1. Condiciones óptimas para el cultivo de líneas celulares de cáncer de mama**

<i>Línea celular</i>	<i>Cantidad de medio RPMI 1640</i>	<i>Antibiótico</i>	<i>Suplemento</i>
HCC 1937	5 ml	1% penicilina-estreptomomicina	2 mM de glutamina, 10% suero fetal bovino
MCF 7	5 ml	1% penicilina-estreptomomicina	2 mM de piruvato, 10% suero fetal bovino
MDA MB 231	5 ml	1% penicilina-estreptomomicina	2 mM de piruvato, 10% suero fetal bovino .

Elaboración propia.

## Descongelamiento de las líneas celulares

El descongelamiento de las líneas celulares se debe realizar lo más rápido posible, para ello, una vez retirado el vial que contiene las células del congelador (-70 °C), se hará el siguiente procedimiento:

- a) Mantener el vial con las células durante 5 minutos a temperatura ambiente para favorecer el descongelamiento.
- b) Agregar 1 ml de medio de cultivo RPMI1640 suplementado, mantenido previamente a una temperatura de 37 °C al vial con las células y resuspender.
- c) Traspasar el contenido del vial a un tubo Falcon de 15 ml.
- d) Centrifugar durante 3 minutos a una velocidad de 800 x g.
- e) Retirar el sobrenadante del botón celular.
- f) Agregar 1 ml de medio de cultivo RPMI1640 suplementado al botón celular y resuspender.
- g) Traspasar el contenido del tubo a la caja de cultivo para completar 5 ml que es volumen de trabajo ideal.

- h) Observar al microscopio para identificar la presencia de células en suspensión.
- i) Colocar en la incubadora a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Nota: se recomienda previamente colocar la caja de cultivo con 4 ml de medio RPMI 1640 (suplementado en base a las especificaciones para cada línea celular), dentro de la incubadora durante 20 minutos previo a agregar las células, esto con el fin de que el medio se encuentre a la temperatura óptima y con el adecuado intercambio de gases para las células.

### Cambio de medio de las líneas celulares

El medio de cultivo se debe cambiar cada tercer día con el fin de eliminar los desechos celulares y aportar nuevos nutrientes a las células, éste se realiza mediante los siguientes pasos:

- a) Retirar el medio de cultivo de la caja.
- b) Lavar la caja con 3 ml de PBS (pH 7.4) por duplicado, cuidando el agregar lentamente el PBS por uno de los costados de la caja para evitar despegar las células adheridas.
- c) Agregar 5 ml de medio de cultivo suplementado con base a las especificaciones para cada línea celular.
- d) Colocar en la incubadora a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Nota: en el caso del descongelamiento, el cambio de medio se debe realizar a las 24 horas después de la siembra para retirar las células que no se fijaron y agregar nuevos nutrientes que le den soporte a las células adheridas.

### Expansión de las líneas celulares

Cuando la confluencia de las células es superior al 80%, se debe realizar el pasaje de las células a dos cajas nuevas para continuar con el cultivo celular. Este procedimiento se debe realizar mediante los siguientes pasos:

- a) Retirar el medio de cultivo de la caja de cultivo.
- b) Lavar dos veces la caja con 3 ml de PBS (pH 7.4).

- c) Agregar 3 ml de tripsina (0.05% tripsina, 0.02% EDTA, en PBS), con el fin de despegar las células de la caja de cultivo.
- d) Incubar 3 minutos a 37 °C.
- e) Agregar 3 ml de medio de cultivo suplementado para inactivar la acción de la tripsina.
- f) Traspasar el contenido de la caja a un tubo Falcon de 15 ml.
- g) Centrifugar a 800 x g durante 3 minutos.
- h) Retirar el sobrenadante del botón celular.
- i) Agregar 10 ml de medio de cultivo y resuspender el botón celular.
- j) Colocar 5 ml de suspensión celular en cada caja de cultivo.
- k) Colocar en la incubadora a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

### Preservación de las líneas celulares

Cuando se desea preservar una línea celular con el fin de tener un respaldo, se deben realizar los siguientes pasos:

- a) Retirar el medio de cultivo de la caja de cultivo.
- b) Lavar dos veces la caja con 3 ml de PBS (pH 7.4).
- c) Agregar 3 ml de tripsina (0.05% tripsina, 0.02% EDTA, en PBS), con el fin de despegar las células de la caja de cultivo.
- d) Incubar 3 minutos a 37 °C.
- e) Agregar 3 ml de medio de cultivo suplementado para inactivar la acción de la tripsina.
- f) Traspasar el contenido de la caja a un tubo Falcon de 15 ml.
- g) Centrifugar a 800 xg durante 3 minutos.
- h) Retirar el sobrenadante del botón celular.
- i) Agregar 1 ml de medio de cultivo y resuspender el botón celular.
- j) Traspasar el contenido del tubo a un vial de preservación.
- k) Suplementar el contenido del vial al 20% de suero fetal bovino y 10% de DMSO.
- l) Congelar a -70 °C.

Nota: se recomienda que el proceso de congelamiento se lleve a cabo lentamente, por lo que se sugiere emplear geles de enfriamiento para recubrir el vial y así el

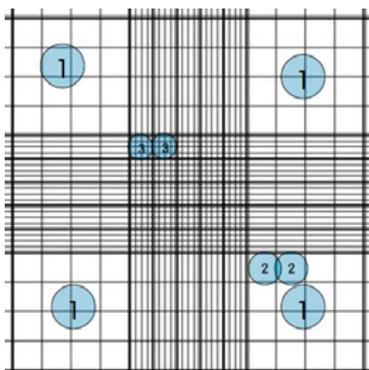
proceso de congelamiento se lleve a cabo lentamente y no exista la formación de cristales que puedan dañar a las células.

## Ensayos de proliferación

Para llevar a cabo ensayos que permitan evaluar aumentos o decrementos de la proliferación celular de las distintas líneas celulares de cáncer de mama al ser estimuladas con distintos agentes se deben emplear 5000 células de cada línea celular por pozo y por triplicado, en placas de 96 pozos permitiendo su crecimiento previo a estimulación durante 24 horas y 48 horas para generar dos grupos de estudio. La siembra de las 5000 células por cada pozo se debe llevar a cabo la siguiente metodología:

- a) Retirar el medio de cultivo de la caja de cultivo.
- b) Lavar dos veces la caja con 3 ml de PBS (pH 7.4).
- c) Agregar 3 ml de tripsina (0.05% tripsina, 0.02% EDTA, en PBS), con el fin de despegar las células de la caja de cultivo.
- d) Incubar 3 minutos a 37 °C.
- e) Agregar 3 ml de medio de cultivo suplementado para inactivar la acción de la tripsina.
- f) Traspasar el contenido de la caja a un tubo Falcon de 15 ml.
- g) Centrifugar a 800 xg durante 3 minutos.
- h) Retirar el sobrenadante del botón celular.
- i) Agregar 1 ml de medio de cultivo y resuspender el botón celular.
- j) Tomar 10 µL de la suspensión celular y realizar una dilución 1:10 agregando 90 µL de azul de tripán al 0.4% en un tubo Eppendorf.
- k) Mezclar la dilución por pipeteo de cinco a ocho veces.
- l) Colocar 10 µL de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro (Cámara de Neubauer).
- m) Dejar que las células se asienten durante 1-2 minutos y proceder al conteo.
- n) Llevar a cabo la cuenta celular para cada cuadrante externo (cuadros 4 x 4, marcados con el número 1 en la figura 4), las células localizadas en los márgenes externos de cada esquina no deberán ser incluidas. Las células que se deben considerar en el conteo son aquellas birefringentes o blancas, ya que estas son células vivas, las células teñidas de azul son células muertas.

Figura 4. Cuadrantes de la cámara de Neubauer



Fuente: <http://www.celeromics.com>

- o) Llevar a cabo el cálculo de la cantidad de células presentes en el ml de suspensión celular, empleado la fórmula:
- p) Cantidad de células = (núm. de células vivas  $\div$  4)  $\times$  factor de dilución  $\times$  10 000. Una vez determinada la cantidad de células en la suspensión, se deben realizar los cálculos pertinentes para realizar una dilución que garantice la presencia de 5000 células en 248  $\mu$ L de medio, que es el volumen a colocar en cada pocillo de la placa.

Nota: se consideran 248  $\mu$ L de la dilución de células para colocar por pozo, ya que el volumen ideal de trabajo para la placa de 96 pozos es de 250  $\mu$ L por pozo, así en cada cambio de medio se agregarán 248  $\mu$ L de medio de cultivo y el 1% restante corresponde al estímulo.

Posteriormente cada 24 horas durante 96 horas se lavarán las células con PBS (250  $\mu$ L/pozo) y se adicionará medio de cultivo fresco (suplementado al 5% de suero fetal bovino) con el estímulo a evaluar. La disminución del suero fetal bovino se realizará para disminuir los factores de crecimiento que pudieran interferir con la acción del agente a analizar. Para llevar a cabo la tinción con cristal violeta que permitirá evaluar la proliferación celular se debe llevar a cabo lo siguiente:

- a) Al término del estímulo se deben fijar las células con formaldehído al 4% (250  $\mu$ L/pozo) durante 15 minutos.

- b) Lavar cada pocillo con PBS (250  $\mu$ L/pozo).
- c) Teñir cada pocillo con 100  $\mu$ L de cristal violeta al 0.2% durante 15 minutos, la ventaja de utilizar este colorante es su fácil adquisición y su capacidad para unirse a las proteínas y al DNA, lo que lo hace un método de detección rápido y confiable.
- d) Lavar cada pocillo con 300  $\mu$ L de agua destilada por triplicado o hasta garantizar que se han eliminado todos los residuos de colorante.
- d) Adicionar a cada pozo 250  $\mu$ L de ácido acético al 10%.
- f) Leer la placa en un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de emisión de 630 nm.

### Análisis de microensayos

La regulación de la expresión génica de algún gen de interés en las líneas celulares de cáncer de mama se evaluará por medio de la estimulación de las células con algún agente a estudiar, mediante la siguiente metodología propuesta por Jardé y colaboradores (Jardé et al., 2009).

Para llevar a cabo estos ensayos se deben sembrar 20 000 células de cada línea celular (véase apartado de siembra de células en los ensayos de proliferación celular) en placas de 24 pozos durante 48 horas. Como nota, se debe ajustar el volumen de trabajo a 1 ml por pozo para las placas de 24 pozos.

Posteriormente cada 24 horas durante 96 horas se lavaran las células con PBS (1 ml/pozo) y se adicionará medio de cultivo fresco (suplementado al 5% de suero fetal bovino) con el correspondiente estímulo.

Al término de las 96 horas de estímulo se retirará el medio de cultivo y se adicionará TRIzol Reagent para llevar a cabo la extracción de mRNA de acuerdo al protocolo de uso (Ambion).

### Extracción de mRNA de líneas celulares de cáncer de mama

Para la extracción de mRNA de las líneas celulares MDA-MB 231, MCF 7 y HCC1937, se debe llevar a cabo la siguiente metodología:

- a) Retirar el medio de cultivo de cada pozo, cuidando de no desecharlo (véase apartado de ELISA).
- b) Lavar la caja de cultivo con PBS (3 ml) por duplicado, en caso de que sea en la placa de 24 pozos utilizar 1 ml por pozo.
- c) Si la extracción se realizará a partir de una placa p60 se deben agregar 500  $\mu$ L de PBS y retirar las células mecánicamente con un scraper o raspador celular, pasándolo por toda la superficie de la caja. Colocar la suspensión celular del raspado de la caja en un tubo Eppendorf y centrifugar 10 segundos y retirar el sobrenadante. En simultáneo, en la caja de cultivo colocar 1 ml de reactivo TRIzol, se deja actuar 1 minuto, se retira y se traspasa al botón celular en el tubo Eppendorf. Si la extracción se realiza en la placa de 24 pozos, sólo se debe agregar 750  $\mu$ L de reactivo TRIzol a cada pocillo, dejar actuar 3 minutos y traspasar el contenido a un tubo Eppendorf. Llevar al vórtex hasta homogeneizar, si la extracción no se realizará de manera inmediata se debe congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### *Separación de fase*

- a) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- b) Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de reactivo TRIzol utilizado.
- c) Agitar el tubo vigorosamente durante 15 segundos.
- d) Incubar 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
- e) Centrifugar la muestra a  $12\ 000 \times g$  durante 15 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La mezcla se separa en una fase de fenol-cloroformo de color rojo en la parte inferior, una interfase blanquecina y una fase acuosa superior incolora. El RNA permanece en la fase acuosa: se debe retirar ésta de la muestra, cuidando de no tocar la interfase. La fase fenol-cloroformo contiene DNA y proteínas.

### *Aislamiento*

- a) Agregar 0.5 ml de isopropanol al 100% a la fase acuosa por cada ml de reactivo TRIzol utilizado.
- b) Incubar a temperatura ambiente 10 min.
- c) Centrifugar a  $12\ 000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- d) Observar la formación de un pellet en el fondo del tubo.

*Lavado*

- a) Retirar el sobrenadante del tubo dejando sólo el sedimento de RNA.
- b) Agregar al pellet 1 ml de etanol al 75% por cada ml de reactivo TRIzol usado (realizar este paso por triplicado).
- c) Dejar secar el pellet.

## Cuantificación de RNA de líneas celulares

Una vez extraído el RNA de cada una de las líneas celulares se debe cuantificar en un nanofotómetro utilizando el factor de dilución LID 50 y 1 µL de muestra, se registra la concentración reportada por el equipo en ng/µL de RNA, así como las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230. La relación A260/A280 y A260/A230 debe ser mayor a 1.8 para garantizar buena pureza del RNA extraído pues con la relación A260/A280 se descarta contaminación con proteínas, mientras que la relación A260/A230 descarta contaminación con compuestos aromáticos empleados durante la extracción.

Síntesis de cDNA. Se lleva a cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA) para poder evaluar la expresión génica, esto se realiza a partir de 2 µg de mRNA extraído de cada línea celular por medio de la reacción de transcriptasa reversa de acuerdo al protocolo de uso del Kit High Capacity RNA to cDNA (Thermo Fisher Scientific).

**Tabla 2. Componentes y concentración de reactivos empleados para llevar a cabo la síntesis de cDNA según el kit High Capacity RNA to cDNA**

<i>Componente</i>	<i>Volumen/reacción (µL)</i>	
	+ RT	-RT
2x RT Buffer	10.0	10.0
20x RT Enzyme mix	1.0	-
Nuclease free H <sub>2</sub> O	Q.S. 20 µL	Q.S. 20 µL
Muestra (RNA)	9 µL	9 µL
Total por reacción	20 µL	20 µL

Fuente: protocolo del Kit High Capacity RNA to cDNA. Applied Biosystems.

Para llevar a cabo la reacción se debe colocar en el termociclador a 37 °C durante 60 minutos, se detiene la reacción calentando a 95 °C durante 5 minutos y posteriormente se enfría a 4 °C para su preservación.

## Determinación de expresión génica por RT-PCR

### *Estandarización de primers*

Para llevar a cabo la determinación de la expresión cualitativa de un gen de interés a partir del cDNA obtenido en el proceso anterior se requiere tener por lo menos un par de primers o sondas específicas para el gen que se desea determinar, uno en sentido (Fw) y otro en antisentido (Rv), como características principales para estos primers se desea que cada uno debe contar con una longitud de 20-25 bases, mantener un contenido de G: C (Guanina: Citosina) entre 40 y 60%. Los dos primers del par tendrán una temperatura de fusión ( $T_m$ ) cercana a los 60 °C, con una diferencia no mayor a los 5 °C entre sí, se mantiene una  $\Delta G$  menor a -3 kcal/mol, para evitar interacciones entre ellos. El diseño o elección de los primers es uno de los aspectos más importantes de la PCR, ya que si no son los adecuados pueden amplificar secuencias distintas a las que se quiere detectar.

Una vez diseñados o elegidos, los primers se solicitan a una empresa especializada en su síntesis. Al recibirlos se encuentran liofilizados por lo que es necesario rehidratarlos.

Para este fin se recomienda consultar la hoja de las especificaciones de cada primer entregada por el proveedor, donde se reporta la cantidad en microgramos de primer en cada vial, así con este dato, se puede agregar la cantidad de agua grado PCR necesaria para obtener una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

A continuación se puede cuantificar la concentración de cada primer mediante el uso de un nanoespectrofotómetro, con lo que se confirmará la masa que se tiene de cada uno de ellos. Con el resultado de la cuantificación real se puede obtener la molaridad de cada uno y con esa concentración se recomienda hacer los cálculos necesarios para estandarizar una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  a una concentración 12.5  $\mu\text{M}$  de éstos, que será la alícuota de uso para llevar a cabo la PCR.

*PCR en punto final*

Para llevar a cabo la reacción de PCR es necesario preparar la mezcla de sustancias necesarias que permitan la amplificación de la secuencia específica que se desea determinar, para esto se tienen las siguientes concentraciones de los reactivos a usar.

**Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para PCR punto final**

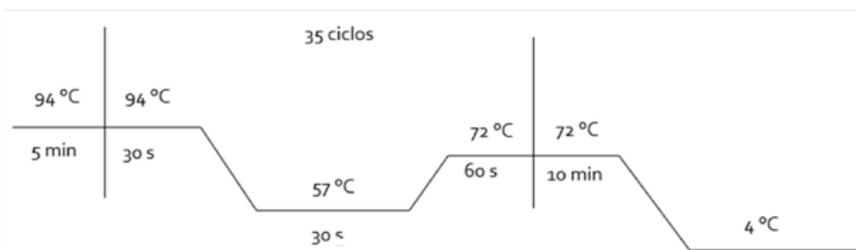
<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (μL) de reactivo adicionado por una reacción</i>	<i>Volumen(μL) de reactivo adicionado por número de reacción (N)</i>
2X PCR Master Mix	12.5	N X 12.5
Primer (forward)	1	N X 1
Primer (reverse)	1	N X 1
cDNA	1	N X 1
Agua	9.5	N X 9.5
Volumen final (para una muestra)	25	N X 25

El reactivo PCR Master Mix contiene los dNTP, MgCl<sub>2</sub>, la polimerasa y el buffer de reacción. Elaboración propia.

Al realizar una PCR se debe integrar además de las muestras, un control negativo (un tubo con los reactivos de PCR, pero sin cDNA) y un gen control o Housekeeping, estos genes se requieren para el mantenimiento de las funciones celulares basales que son esenciales para la existencia de una célula, por lo tanto, se espera que se expresen en todas las células de un organismo en condiciones normales y patológicas, independientemente del tipo de tejido, la etapa de desarrollo, el estado del ciclo celular o la señal externa. Algunos ejemplos de genes Housekeeping son el 18s, GAPDH, tubulina, actina, B2M (Eisenberg y Levanon, 2013).

Una vez realizada la mezcla se llevan los tubos al vórtex durante 15-20 segundos para que todos los reactivos se mezclen; se centrifugan en un spin de 10 segundos y se colocan en el termociclador, ajustando las temperaturas, tiempos y el número de ciclos de acuerdo a los primers diseñados para el gen de interés, a la cantidad de muestra y las indicaciones del PCR Master Mix. De manera general un ejemplo del programa para llevar a cabo una PCR en punto final se muestra en la figura 4.

Figura 5. Ejemplo de un programa para PCR en punto final



Elaboración propia.

### *Electroforesis*

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas de DNA se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga: masa (Lodish, Berka, Matsudaira, Kaiser, Krieger, 2005).

La técnica de electroforesis es de gran utilidad, ya que permite identificar los resultados obtenidos en la PCR, ya que se pueden visualizar las bandas de DNA amplificadas mediante el intercalamiento del bromuro de etidio en la cadena de DNA y el desplazamiento de las moléculas por acción del campo eléctrico. Para llevar a cabo la electroforesis, se realiza la siguiente metodología.

### *Preparación de la solución TAE*

Para preparar un litro del buffer TAE 10X se mezclan 48.4 g de Tris-HCl, 11.42 ml de ácido acético, 7.44 g de EDTA disódico; aforar con agua destilada y ajustar el pH a 7.6. Para disponer de la solución TAE de trabajo (1X) se realiza una dilución 1:10 de la disolución anterior.

### *Preparación del gel de agarosa*

La electroforesis de DNA se lleva a cabo en un gel de agarosa, el cual debe ser preparado con la concentración de agarosa necesaria según el tamaño esperado del amplificado obtenido en la PCR, como se indica en la tabla 4.

**Tabla 4. Porcentaje de agarosa empleada según el tamaño del amplicón esperado**

<i>Agarosa (%)</i>	<i>Tamaño del amplicón</i>
0.3	1 kb-40 kb
0.5	700 pb-25 kb
0.8	500 pb-15 kb
1.0	250 pb-12 kb
1.2	150 pb-6 kb
1.5.	80 pb-4 kb
2.0	60 pb-2.5 kb

Elaboración propia.

Generalmente se utiliza el gel de agarosa al 1.5%. Para preparar este gel se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Pesar 0.6 gramos de agarosa.
- b) Disolver en 40 ml de TAE 1X.
- c) Colocar en agitación y calentar hasta que la agarosa se funda totalmente y se convierta en una disolución transparente.
- d) Agregar 3  $\mu$ L de bromuro de etidio.
- e) Dejar enfriar un poco y colocar en la cámara de electroforesis.
- f) Colocar el peine con el número de pocillos necesario para el número de muestras a correr y dejar enfriar hasta que solidifique.

### *Carga y corrimiento de las muestras para electroforesis*

- a) Cuando el gel se encuentra solidificado dentro de la cámara de electroforesis se añade el buffer de electroforesis (TAE 1x) procurando que se cubra el gel se cubra totalmente.
- b) Retirar el peine para que queden libres los pocillos para colocar las muestras.

- c) Mezclar los amplificados obtenidos de la PCR con el buffer de carga (azul de Bromofenol 0.09%, xilencianol 0.09% y glicerol 60%).
- d) Cargar en los pocillos las muestras (generalmente es un volumen de 15 a 20  $\mu$ L), el marcador de peso molecular y el control negativo.
- e) Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 20-150 V (1-5 V/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos). Regularmente se utilizan 90 V durante 1 hora. Esto depende del tamaño de los amplificados y se ajusta el voltaje y el tiempo a dicha característica.
- f) Correr el gel hasta que el azul de bromofenol haya recorrido aproximadamente el 75% de la longitud total del gel. Cuando llegue a este punto detener la electroforesis.

### *Visualización de las bandas de los amplificados de DNA*

Para observar las bandas de amplificación de DNA, se coloca el gel sobre un transiluminador y se enciende la lámpara de luz ultravioleta con una longitud de onda de 300 nm. El DNA se visualizará como bandas de color anaranjado. Se coloca después un fotodocumentador que permite tomar una fotografía de las bandas obtenidas para su posterior análisis.

### PCR en tiempo real (qPCR)

El principio de la técnica de PCR en tiempo real se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en que se detectan y analizan los productos de la amplificación es distinta. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción por determinación de la fluorescencia obtenida en cada ciclo. Por su parte, es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible conocer la secuencia blanco (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013). El PCR en tiempo real contempla los siguientes pasos: el cDNA obtenido a partir de los estímulos de las líneas celulares se utilizará para realizar la determinación de la expresión génica por PCR en tiempo real empleando como Kit de Master Mix para qPCR el TaqMan Universal Mix II, with UNG (Biosystems, 2002).

Para detectar la secuencia específica del gen de interés se utilizarán las sondas TaqMan (Gene Expression Assays, Applied Biosystems), incluyendo una sonda para el gen Housekeeping (véase apartado de genes Housekeeping en PCR punto final).

Posteriormente siguiendo las instrucciones del termociclador Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics), se utilizará el siguiente programa de amplificación: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min y 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto.

Para la determinación del grado de expresión génica del gen de interés se utilizará el método de cuantificación relativa de Pfaffl (2004), basado en la comparación del CT de un gen constitutivo (Housekeeping) contra el gen problema, tomando el valor de sus diferencias contra la línea control para cada muestra (se realizará por duplicado).

**Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para PCR tiempo real**

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (μL) de reactivo adicionado por una reacción</i>	<i>Volumen(μL) de reactivo adicionado por número de reacción (N)</i>
TaqMan Universal Mix II, with UNG	2.5	N X 2.5
Sonda Taqman	1.25	N X 1.25
c DNA	1	N X 1
Agua	7.75	N X 7.75
Volumen final (para una muestra)	12.5	N X 12.5

El reactivo TaqMan Universal Mix II, with UNG, contiene los dNTP, MgCl<sub>2</sub>, la polimerasa y el buffer de reacción. Elaboración propia.

## Determinación de expresión génica a nivel proteómico

El siguiente paso a la determinación de la expresión de un gen a nivel de ácidos nucleicos es la identificación y cuantificación de la proteína codificada por dicho gen, esto se hace mediante diversas técnicas, entre las que se encuentran: ELISA y Western Blot.

## Determinación de proteínas por ELISA

El ensayo ELISA utiliza el concepto inmunológico básico de la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, lo que permite la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos, como proteínas, hormonas o anticuerpos en una muestra líquida. El

antígeno en fase líquida se inmoviliza, generalmente en placas de microtitulación de 96 pozos. Se permite que el antígeno se una a un anticuerpo específico, que a su vez es detectado por un anticuerpo secundario acoplado a enzimas. Un sustrato cromogénico para la enzima produce un cambio de color visible o fluorescencia, lo que indica la presencia de antígeno. Las medidas cuantitativas o cualitativas pueden evaluarse basándose en dicha lectura colorimétrica. Los sustratos fluorógenos tienen una mayor sensibilidad y pueden medir con precisión los niveles de concentración de antígeno en la muestra (Gan y Patel, 2013).

La metodología para llevar a cabo este ensayo, depende en gran medida del Kit de ELISA que se utilizará para detectar la proteína de interés, sin embargo, de manera general la metodología a llevarse a cabo es la siguiente, según los kits de ELISA Creative Diagnostics:

- a) En caso de trabajar con líneas celulares, la determinación de los niveles de proteína se pueden detectar en sobrenadante del cultivo celular, por lo que después de realizar la estimulación de las células el sobrenadante se guarda en tubos Eppendorf, centrifugar (1000 x g 10 minutos) y utilizar inmediatamente, o guardar a -70 °C.
- b) Colocar 100 µL de la muestra diluida en solución buffer a la placa prerrecubierta con anticuerpo antireceptor de leptina humano.
- c) Incubar durante 90 minutos a 37 °C.
- d) Vaciar la placa y eliminar el líquido residual.
- e) Agregar 100 µL de solución de anticuerpo antireceptor de leptina humano biotinilado a cada pozo.
- f) Incubar una hora a 37 °C, vaciar la placa y eliminar el líquido residual.
- g) Llenar cada pozo con solución de lavado, vaciar la placa y eliminar el líquido residual (repetir de 3 a 5 veces).
- h) Colocar 100 µL de complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) a cada pozo, vaciar la placa, e incubar 30 minutos a 37 °C.
- i) Llenar cada pozo con solución de lavado, vaciar la placa y eliminar el líquido residual (repetir de 3 a 5 veces).
- j) Agregar 90 µL de agente de revelado de color TMB, incubar 20 minutos a 37 °C en la oscuridad.
- k) Agregar 100 µL de solución de paro TMB a cada pozo.
- l) Leer la placa con el lector de microplacas (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology) a una longitud de onda de 450 nm.

- m) Se realizará una curva estándar de concentraciones conocidas de la proteína a determinar y se interpolarán las absorbancias obtenidas en cada pozo, para obtener la concentración de proteína en cada prueba.

## Western Blot

La técnica de Western Blot se utiliza en la investigación para la separación e identificación de proteínas. En ésta una mezcla de proteínas se separa en función del peso molecular, mediante electroforesis en gel, una vez que se aíslan, se transfieren a una membrana que produce una banda para cada proteína. La membrana luego se incuba con marcadores de anticuerpos específicos para la proteína de interés y se revela (Mahmood y Yang, 2012). El Western Blot se considera la técnica de oro para la identificación de proteínas y sirve para confirmar los resultados obtenidos en la técnica de ELISA. La metodología para llevar a cabo esta técnica incluye los siguientes pasos:

### *Lisis celular para extracción de proteínas*

- a) Lavar las células en la caja de cultivo con PBS y agitarlas suavemente. Desechar el PBS.
- b) Agregar 500  $\mu\text{L}$  de PBS y retirar las células mecánicamente con un scraper o raspador celular, pasándolo por toda la superficie de la caja. Transferir el contenido en tubos de microcentrífuga.
- c) Centrifugar a 1500 RPM durante 5 minutos y desechar el sobrenadante.
- d) Agregar 180  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis de células, con 20  $\mu\text{L}$  de inhibidor de proteasas recién preparado.
- e) Incubar durante 30 minutos en hielo y luego aclarar el lisado centrifugando durante 10 minutos a 12 000 RPM, a 4 °C.
- f) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y resguardar en hielo (si se utilizará al instante) o congelar a -70 °C.
- g) Medir la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro.

*Preparación de la muestra*

1. Colocar 50 µg de proteína de cada ensayo.
2. Agregar 5 µL de buffer de muestra a la proteína y mezclar bien.
3. Calentar las muestras durante 5 minutos a 100 °C.

*Preparación del gel de electroforesis*

Para llevar a cabo la electroforesis en western blot es necesario preparar un gel de poliacrilamida con dos secciones, una parte que corresponde al gel de corrimiento y otra al gel de carga. Para prepararlas se sugieren las cantidades de reactivos presentes en las tablas 6 y 7.

**Tabla 6. Reactivos para preparación del gel de corrimiento de poliacrilamida**

<i>%Acrilamida</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>15</i>
H <sub>2</sub> O	5.3 ml	4.6 ml	4 ml	3.3 ml	2.3 ml
Mezcla de acrilamida*	2 ml	2.7 ml	3.3 ml	4 ml	5 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
10% APS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.008 ml	0.006 ml	0.004 ml	0.004 ml	0.002 ml
Vol. Final	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml*

La mezcla de acrilamida es un stock al 30% de acrilamida-bisacrilamida.

Elaboración propia.

**Tabla 7. Reactivos para preparación del gel de carga de poliacrilamida**

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
H <sub>2</sub> O	2.1 ml
Mezcla de acrilamida*	0.5 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10% APS	0.3 ml
TEMED	0.003 ml
Vol. Final	3 ml

\*La mezcla de acrilamida es un stock al 30% de acrilamida-bisacrilamida.

Elaboración propia.

- a) Después de preparar la disolución del gel de corrimiento (el porcentaje de acrilamida depende del tamaño de las proteínas a separar), se coloca la cámara para la solidificación del gel.

Nota: El 10% de APS y el TEMED son los agentes que solidifican la solución; por lo tanto, ambos geles se pueden preparar al mismo tiempo, si los reactivos mencionados anteriormente no se agregan hasta el final.

- b) Agregar la solución de gel de corrimiento hasta que el nivel sea igual a la barra que sostiene las placas de vidrio. Agregar 1 ml de H<sub>2</sub>O a la parte superior. Espere entre 15 y 30 minutos hasta que el gel se solidifique. Retirar el agua de la parte superior.
- c) Cubrir el gel de corrimiento con el gel de carga.
- d) Insertar el peine, asegurándose de que no haya burbujas de aire.
- e) Esperar hasta que el gel se solidifique.

### *Electroforesis*

- a) Llenar la cámara con el buffer de electroforesis.
- b) Colocar el gel dentro del electroforador y conectarlo a una fuente de alimentación.
- c) Asegúrese de que el buffer cubra completamente el gel, que no se derrame y retirar el peine cuidadosamente.
- d) Cargar el marcador de peso molecular (6 µL) seguido de las muestras (15 µL) en cada pozo.
- e) Correr el gel con bajo voltaje (60 V) para la separación de las proteínas en el gel de carga y utilizar un voltaje más alto (140 V) para el gel de corrimiento.
- f) Dejar correr el gel aproximadamente una hora, o hasta que el frente del buffer de carga salga por la parte inferior del gel.

### Transferencia

- a) Cortar hojas de papel filtro a la medida del gel y una membrana de nitrocelulosa con las mismas dimensiones.
- b) Humedecer una lámina de esponja y el papel filtro en buffer de transferencia, y humedecer la membrana de nitrocelulosa en metanol.

- c) Separar las placas de vidrio y recuperar el gel de poliacrilamida.
- d) Hacer un sándwich de transferencia de la siguiente manera:  
Esponja, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro, esponja

Nota: Siempre se debe asegurar de que no hayan burbujas de aire entre el gel y la membrana de nitrocelulosa.

- e) Colocar el sándwich en el aparato de transferencia en hielo para mantener a 4 °C. Agregar el buffer de transferencia al aparato y asegurarse de que el sándwich esté cubierto con el buffer. Coloque los electrodos en la parte superior de la cámara, asegurándose de que la membrana de nitrocelulosa esté entre el gel y el electrodo positivo.
- f) Llevar a cabo la transferencia por 90 minutos aproximadamente.

### *Bloqueo e incubación de anticuerpos*

- a) Bloquear la membrana con leche descremada al 5% en TBST (Solución salina tamponada con Tris y Tween-20) durante 1 hora.
- b) Agregue el anticuerpo primario en albúmina de suero bovino (BSA) al 5% e incube durante la noche a 4 °C en un agitador.
- c) Lavar la membrana con TBST durante 5 minutos. Haga esto 3 veces. (Consejo: todos los pasos de lavado e incubación de anticuerpos se realizan en un agitador a temperatura ambiente para garantizar una agitación uniforme).
- d) Agregue el anticuerpo secundario en leche descremada al 5% en TBST (solución salina tamponada con Tris y Tween-20) e incubar durante 1 hora.
- e) Lavar la membrana con TBST durante 5 minutos por triplicado.
- f) Agregar la dilución del anticuerpo primario (siguiendo las indicaciones del fabricante). Incubar la membrana una hora, realizar los lavados correspondientes.
- g) Agregar la dilución del anticuerpo secundario (siguiendo las indicaciones del fabricante) e incubar la membrana una hora, realizar los lavados correspondientes.
- h) Visualizar el resultado en un cuarto oscuro, mediante una reacción de quimioluminiscencia (generalmente se utiliza luminol).

## Bioseguridad

Algunos de los componentes utilizados en las técnicas descritas anteriormente como la electroforesis de geles de agarosa y de poliacrilamida son tóxicos y es necesario tomar precauciones especiales en su manejo.

En el caso de los geles de agarosa se utiliza el bromuro de etidio, que actúa como agente intercalante en el DNA y permite su visualización mediante el uso de luz UV. El bromuro de etidio es un agente mutagénico de efecto acumulativo, es nocivo por ingestión, tóxico por inhalación e irritante para los ojos, la piel y las vías respiratorias. Las disoluciones de tinte de bromuro de etidio deben ser manejadas siempre con guantes y pueden descontaminarse de la siguiente forma: agregar agua hasta que su concentración esté por debajo de 0.5 µg/ml, a esta solución añadirle 0.2 volúmenes de ácido hipofosforoso, al 5% recién preparado y 0.2 volúmenes de solución fresca de nitrito de sodio 0.5 M; mezclar con cuidado y checar que el pH sea inferior a 3, dejar incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h y agregar un volumen de bicarbonato de sodio 1 M. En este momento la solución puede desecharse (Hierro, 2014).

En el caso de los geles de acrilamida es imperante tener especial cuidado ya que la acrilamida en polvo y en disolución es tóxica, y tiene la capacidad de penetrar a través de la piel. Se recomienda evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularla en campana de extracción), y se deben manejar las disoluciones siempre con guantes. Una vez polimerizada los geles ya no resultan tóxicos, sin embargo aun es necesario colocar guantes para su manipulación (Hierro, 2014).

Adicionalmente el uso de luz ultravioleta para el revelado de las bandas de electroforesis también conlleva protección especial, ya que los ojos y la piel necesitan protegerse adecuadamente mediante el uso de pantallas que filtren las longitudes de onda correspondientes a luz UV (Hierro, 2014).

Con los residuos peligrosos biológico-infecciosos como los obtenidos partir de los cultivos celulares, donde se incluyen las cajas de cultivo, tubos, pipetas desechables, etc., tendrán que ser inactivados con una disolución al 10% de hipoclorito de sodio y posteriormente desechados en bolsas de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 debidamente marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda “residuos peligrosos biológico-infecciosos” tal y como lo marca la Norma Oficial Mexicana Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo (NOM-087-ECOL).

## CONCLUSIÓN

La investigación actual sobre los factores que intervienen en el desarrollo de patologías como el cáncer mama, se basa en la identificación específica de genes y proteínas asociados con factores de riesgo, factores que favorecen un peor pronóstico y desarrollo de la enfermedad e incluso que afectan la efectividad del tratamiento.

Para llevar a cabo la identificación de dichos genes y proteínas es necesario realizar ensayos de expresión génica, que permitan evaluar el efecto de ciertas sustancias sobre la expresión de un gen tanto a nivel de ácidos nucleicos (DNA y RNA), como a nivel de proteínas.

Dentro de las técnicas más ampliamente utilizadas para este fin se encuentran: el cultivo celular, RT-PCR, qPCR, ELISA y Western Blot; sin embargo, estas técnicas se pueden ampliar utilizando algunas complementarias que permitan tener una visión más amplia e integral del proceso de expresión génica. Algunas de estas técnicas adicionales son la secuenciación, transfección, análisis de fosforilación de proteínas.

## REFERENCIAS

ATCC HTB26., n.d. *MDAMB231*.

ATCC CRL2336, 1997. HCC 1937, 1-2.

Biosystems, A., 2002. TaqMan, Universal PCR.

Comsa, Ş.; Cimpean, A. M. y Raica, M., 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* [en línea], 35, 3147-3154.

Disponible en: <https://doi.org/10.1038/430021a>

ECACC., 2017. Cell line profile. *European Collection of Cell Cultures* [en línea], 2780 (93112519), 87092802. Disponible en: [https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85120602ycollection=ecacc\\_gc](https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85120602ycollection=ecacc_gc)

Eisenberg, E. y Levanon, E. Y., 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics* [en línea], 29 (10), 569-574. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>

Espié, M.; Hamy, A. S.; Eskenazy, S.; Cuvier, C. y Giacchetti, S., 2013. Epidemiología del cáncer de mama. *EMC-Ginecología-Obstetricia* [en línea], 49 (1), 1-19. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(13\)64078-3](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(13)64078-3)

- Gan, S. D. y Patel, K. R., 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology* [en línea], 133 (9), 1-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Hierro, F., 2014. Electroforesis de DNA. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 27-52.
- Holliday, D. L. y Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Holliday and Speirs Breast Cancer Research* [en línea], 13. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- Santillán Benítez, J. G.; Quiroz Ordóñez, Á.; Mendieta Zerón, H. y Gómez Oliván, L. M., 2015. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas. *Revista de Medicina e Investigación*, 3 (1), 8-16.
- Jardé, T.; Caldefie Chézet, F.; Goncalves Mendes, N.; Mishellany, F.; Buechler, C.; Penault Llorca, F. y Vasson, M. P., 2009. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: Clinical and in vitro studies. *Endocrine-Related Cancer* [en línea], 16 (4), 1197-1210. Disponible en: <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0043>
- Lodish, H.; Berka, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. y Krieger, M. S. M., 2005. Biología Celular y Molecular-Lodish. In *Biología celular y Molecular* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/558>
- Mahmood, T. y Yang, P. C., 2012. Western Blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [en línea], 4 (9), 429-434. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Martínez Carpio, P. A. y Navarro Moreno, M. A., 2003. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista de Oncología*, 5 (4), 184-191.
- Neve, R. M.; Chin, K.; Fridlyand, J.; Yeh, J.; Frederick, L.; Fevr, T.; ... Berkeley, L., 2009. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally. *Cancer Cell* [en línea], 10 (6), 515-527. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008.A>
- Norma Oficial Mexicana Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo, 2002. (NOM-087-ECOL-SSA-2002).
- Osborne, C. K.; I, K. H.; Trent, J. J. M. y Hobbs, K., 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment* [en línea], 9 (2), 111-121. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF01807363>

- Pfaffl, M. W., 2004. Relative quantification. *Real-Time PCR* [en línea], 63-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1756-6614-3-5>
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C. y Velasquillo, C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea], 2 (5), 70-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Tomlinson, G. E.; Chen, T. T. L.; Stastny, V. A.; Virmani, A. K.; Spillman, M. A.; Tonk, V.; ... Gazdar, A. F., 1998. Characterization of a Breast Cancer Cell Line Derived from a Germ-Line BRCA1 Mutation Carrier. *Cancer Res.* [en línea], 58 (15), 3237-3242. Disponible en: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/15/3237.abstract?ijkey=a2ede4e9235dc77b313676c8bd0da61e5535ba16ykeytype2=tf\\_ipsecsha](http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/15/3237.abstract?ijkey=a2ede4e9235dc77b313676c8bd0da61e5535ba16ykeytype2=tf_ipsecsha)

# POLIMORFISMO DEL CYP1A1 ILE462VAL Y SU RELACIÓN CON DIVERSOS TIPOS DE CÁNCER. ¿EFECTO CAUSANTE O PROTECTOR? UNA REVISIÓN

*Esmeralda Michelle Sánchez Ocampo*<sup>1\*</sup>

*Leobardo Manuel Gómez Oliván*<sup>1</sup>

*Guillermo Elizondo Azuela*<sup>2</sup>

*Mineko Shibayama Salas*<sup>2</sup>

En la actualidad la exposición a diversos contaminantes se considera un factor importante en el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas cáncer; por esta razón resulta importante encontrar la relación a nivel de genética individual y proporcionar un panorama general de la influencia de factores ambientales y genéticos, con respecto a la problemática actual de incidencia de cáncer en diversas poblaciones.

La presente revisión tiene como objetivo identificar a través de diversos estudios reportados hasta este año 2018 la participación del polimorfismo Ile462Val del CYP1A1 en el desarrollo de cáncer. El CYP1A1 es un gen que se encuentra involucrado en el metabolismo de un gran número de sustancias consideradas como contaminantes las cuales están presentes en el medio ambiente y todos los organismos están expuestos diariamente. La búsqueda bibliográfica fue realizada analizando artículos publicados en español e inglés, a través de Pubmed, Science Direct, Elsevier, Redalyc y revistas médicas especializadas, desde 2008 hasta el primer trimestre del 2018, se consideraron únicamente los estudios que relacionaran el polimorfismo mencionado con cáncer, sin limitar el tipo de población. Los resultados muestran que a pesar de existir investigaciones contradictorias en general se observa una asociación del polimorfismo con diferentes tipos de cáncer, diversas enfermedades, es ligeramente mayor en poblaciones caucásicas, y que existen factores como el tabaquismo y la regulación hormonal que también se encuentran involucrados, aunque su participación no ha sido definida significativamente. La presencia de

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* [ems4nchezo@gmail.com](mailto:ems4nchezo@gmail.com)

<sup>2</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV)

este polimorfismo puede incrementar el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer, lo que apoya la hipótesis de que los contaminantes pueden tener influencia en el desarrollo de múltiples padecimientos en contraste con individuos que no presentan el polimorfismo.

## INTRODUCCIÓN

A través de los años el uso de la tecnología ha permitido tener grandes avances en materia de salud, también se han desencadenado diversos factores que favorecen el desarrollo de enfermedades, algunas de ellas con altos índices de mortalidad a nivel mundial, como es el caso del cáncer. Si bien existen diversos tratamientos aún hay mucha información que falta por esclarecer para entender la etiología del padecimiento (Torre et al., 2015).

Actualmente se tiene acceso a una cantidad considerablemente significativa de investigaciones, mismas que se han realizado en distintas partes del mundo, esto permite conocer el panorama general de la salud poblacional. Tales han permitido identificar graves problemas de salud que pueden estar relacionados con la presencia de contaminantes emergentes (Gil, Soto, Usma y Gutiérrez, 2012).

Los contaminantes emergentes, también llamados microcontaminantes, son compuestos químicos producto de las actividades cotidianas humanas como efluentes industriales, hospitalarios, domésticos e incluso por actividades agrícolas y ganaderas; que hasta hace muy poco no se habían considerado como perjudiciales, es por esta razón que tienen poca o nula regulación. Generalmente se liberan al ambiente en pequeñas cantidades pero con el tiempo y debido a su uso intensivo y generalizado, se van acumulando en el entorno. Lo preocupante es que aún a bajas concentraciones pueden tener efectos negativos en los seres vivos, sobre todo a largo plazo. Los contaminantes emergentes se acumulan en cuerpos de agua ocasionando la pérdida de biodiversidad de ecosistemas acuáticos. Asimismo, han generado la aparición de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos. Muchas de estas sustancias, debido a sus características fisicoquímicas, son metabolizadas por complejos enzimáticos, tales como el citocromo P450 (Alan et al., 2008; Becerril Bravo, 2009; Calderón Preciado, Matamoros y Bayona, 2011; López y Alda, 2001; Pennington et al., 2018; Sophia A. y Lima, 2018; Undiano, 2017).

Es por ello que se revisarán algunos conceptos básicos de uno de los principales grupos enzimáticos involucrados en el metabolismo de diversas sustancias, así como alteraciones en su expresión y actividad en algunos tipos de cáncer.

### Citocromo P450 (CYP450)

Cotidianamente los organismos están expuestos a un gran número de sustancias, llamadas xenobióticos; estimaciones elevan a varios miles el número de moléculas nuevas introducidas cada año y agrandan la larga lista de xenobióticos, entre ellos los fármacos, a los cuales la mayoría de los seres vivos se enfrentan (Coutiño Rodríguez y Purata, 2010), mismos que penetran por la piel, sangre, pulmones, etc., y pueden ocasionar trastornos inmediatos o a largo plazo, lo que se reduce o evita gracias a que poseemos sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación (B. y T., 2004). La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en dos fases:

- a) Fase I: catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450.
- b) Fase II: participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, glutatión o algunos aminoácidos (Coutiño Rodríguez, Purata, 2010).

Debido a que la mayoría de estos xenobióticos son de naturaleza liposoluble, es decir, poseen baja solubilidad en agua, les impide ser eliminados por los fluidos corporales, orina, bilis, sudor y lágrimas; por ello la finalidad de los sistemas metabolizantes es transformarlos a compuestos más polares aumentando su solubilidad en agua y facilitando su excreción. Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como fármacos, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos y solventes orgánicos, entre muchos otros; la familia CYP450 interfiere en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, vitaminas liposolubles, hormonas esteroidales y ácidos grasos (B. y T., 2004; Coutiño Rodríguez y Purata, 2010; Martínez Jiménez, Castell, Gómez Lechón y Jover, 2006; Nebert y Dalton, 2006; Santiago et al., 2002).

Los sustratos son reconocidos por la célula como señales exógenas mediante diversos mecanismos de recepción y entrarán en ella por difusión pasiva o mediante transportadores activos. Los metabolitos que se generan y las propias moléculas no metabolizadas podrán actuar sobre su diana y ser eficaces o resultar tóxicos para la célula por uniones covalentes a proteínas y ácidos nucleicos o por una perturbación en el ciclo celular provocado por estrés oxidativo. El que una droga, carcinógeno o agente terapéutico resulte inocuo para la célula impidiendo su efecto va a depender de la cantidad de sustratos intermedios formados, de la estabilidad química de éstos y de la presencia cercana de enzimas de fase II. Si dichas enzimas pueden actuar, se formarán conjugados que serán excretados de la célula. Además, estas sustancias van a poder actuar como agonistas o antagonistas para inducir o reprimir los genes que codifican para las enzimas de fase I y fase II, regulando así su propio metabolismo (Santiago et al., 2002).

Algunas enzimas del citocromo P450 parecen ser parte de una respuesta adaptativa para desafíos químicos y exposición a compuestos extraños (Freeman, Stirling, Russell y Wolf, 1992). Diversas especies de enzimas CYP450 se caracterizan por ser fácilmente inducibles inclusive por las mismas sustancias que pueden biotransformar, lo que tiene consecuencias clínicas. Además, su expresión y actividad son influenciadas por factores como la edad, sexo, dieta, especie, tejido y estado hormonal, a diferencia de las enzimas clásicas, las cuales presentan especificidad superpuesta para algunos sustratos (Santiago et al., 2002).

Al ser hemoproteínas poseen una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo (grupo prostético), donde se localiza un átomo de hierro. El CYP450 funciona como una monooxigenasa, es decir, cataliza reacciones en las que solamente se incorpora uno de los átomos del oxígeno y el otro se reduce a  $H_2O$ . Además, precisa de un sustrato y un cosustrato para actuar como reductores de los dos átomos de la molécula de  $O_2$ . El sustrato acepta uno de los oxígenos y un cosustrato proporciona átomos de hidrógeno para reducir el otro oxígeno a  $H_2O_2$  (Santiago et al., 2002).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el ion super oxidado, peróxidos, hidroperóxidos han sido implicadas en muchas de las principales condiciones: lesión por isquemia-reperfusión, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, carcinogénesis, diabetes, trastornos neurodegenerativos como Parkinson y Alzheimer, toxicidad por metales pesados como el hierro, lesión por asbesto, lesión por radiación, deficiencia de vitaminas, toxicidad por medicamentos, inflamación, enfisema, toxicidad aguda

asociada con la ingesta crónica de etanol, así como procesos de envejecimiento. Las ERO se pueden producir a partir de muchos sistemas, incluidos el sistema respiratorio mitocondrial, el citocromo P450, enzimas oxidativas como xantina oxidasa, aldehído oxidasa, ciclooxigenasa, monoaminooxidasa, y la NADPH oxidasa, de la oxidación de proteínas hemo como ferrohémoglobina o mioglobina o de bioquímicos como catecolaminas, quinonas o tetrahidrobiopterinas. Las fuentes ambientales incluyen radiación UV, humo y ciertos medicamentos que se metabolizan a radicales intermediarios o que pueden causar ciclos redox. Su toxicidad se debe principalmente a que pueden reaccionar con la mayoría de las macromoléculas celulares y enzimas inactivantes, causando daño en el DNA y peroxidación de lípidos, provocando la destrucción de membranas (Cederbaum, 2006).

El sistema de monooxigenasas del CYP450 está presente prácticamente en todos los organismos eucariontes, en la mayoría de las eubacterias y en algunas arqueobacterias. Esta gran diversidad sólo puede ser entendida desde una perspectiva evolutiva. Debido a que el CYP450 está presente en algunas especies de bacterias termófilas, se estima que esta superfamilia de enzimas se originó hace 3500 millones de años (B. y T., 2004; Elizondo, 2004; Freeman et al., 1992; Santiago et al., 2002). En los mamíferos, el CYP450 se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, es particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso (microsomas). Además, se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta, cerebro y otros, pero es particularmente activo en el hígado (B. y T., 2004; Santiago et al., 2002).

Más de 160 formas han sido caracterizadas utilizando una nomenclatura basada en su homología estructural, deducida a partir de sus correspondientes cDNAs. La nomenclatura se realiza de la siguiente manera: las familias de estas enzimas son designadas por las letras CYP, los citocromos comparten un 40% de homología o superior, cada familia recibe un número del 1 al 10, es decir, CYP1, CYP2, CYP3, etc. En la actualidad hay unas 270 familias clasificadas entre todos los seres vivos, de las cuales 18 de ellas están presentes en humanos (B. y T., 2004; Cederbaum, 2006; Coutiño Rodríguez y Purata, 2010; Teresa, Gualix y Bioquímica, 2004).

Dentro de cada familia hay subfamilias y para ser miembro de una de ellas hay que compartir el 50% de homología de secuencia o superior. Cada miembro de una subfamilia se indica por una letra después del número de familia. CYP1A, CYP2B, etc. (B. y T., 2004; Cederbaum, 2006; Coutiño Rodríguez y Purata, 2010; Teresa, Gualix y Bioquímica, 2004).

Para el caso de polipéptidos o isoformas, dentro de cada subfamilia se puede tener otro citocromo que tenga más del 55% de homología, el cual se indica después de la letra con un número, como sigue, CYP2C8, CYP2C9. Estos números indican la abundancia de miembros dentro de una subfamilia. Cada uno de los polipéptidos que codifican los citocromos, procede de un transcrito primario del gen que puede, en algunos casos, ser procesado de modo alternativo, produciendo diferentes RNAm y por consiguiente diferentes proteínas, las cuales pueden tener diferentes capacidades de reconocimiento y catálisis de los sustratos oxidables (B. y T., 2004; Cederbaum, 2006; Coutiño Rodríguez y Purata, 2010; Teresa, Gualix y Bioquímica, 2004).

Debido a su participación en la desactivación o activación de numerosos xenobióticos como lo son contaminantes ambientales, medicamentos o aditivos presentes en los alimentos, el estudio de los CYP450 tiene un interés particular para la toxicología y la farmacología (Elizondo, 2004).

## Familia CYP1A

La subfamilia CYP1 contiene las isoformas 1A1, 1B1 y 1A2, que están implicadas en la hidroxilación de una gran cantidad de procarcinógenos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) benzo [a] pireno [BaP], óxidos, aminas y estrógenos a productos químicos citotóxicos, mutagénicos y cancerígenos. Esta familia se induce por el humo de tabaco, cRNAe carbonizada, dioxinas, rifampicina y el omeprazol (Coutiño Rodríguez y Purata, 2010; Horley et al., 2017; Santiago et al., 2002).

### CYP1A1

El CYP1A1 es una enzima clave de CYP1 familia relacionada con el metabolismo de muchos sustratos endógenos y procarcinógenos ambientales, puede contribuir a la formación de metabolitos intermedios altamente reactivos, y estos metabolitos pueden formar aductos de DNA, que, si se obstruyen, iniciaría o promovería la oncogénesis. Como tal, CYP1A1 juega un papel crítico en el metabolismo de ambos sustratos endógenos y exógenos (Badal y Delgoda, 2014).

El gen CYP1A1 se localiza en el cromosoma 15q22-q24, está conformado por 7 exones y 6 intrones que comprenden 5,8 kb (Paz y Miño, 2010), constituye la mayor fracción del CYP450 extrahepático, codifica para una enzima con actividad aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH), es inducible por ligandos de los receptores para aril hidrocarburo (AHR), se encuentra en casi todos los tejidos, principalmente en el hígado, pulmones, glándulas mamarias y placenta. Activa a las nitrosaminas, aflatoxinas y principalmente, aril aminas, generando compuestos que se unen al DNA (Coutiño Rodríguez y Purata, 2010; Santiago et al., 2002).

Todos los días, los organismos están expuestos a compuestos que son sustratos de CYP1A1, a través de la contaminación ambiental, los alimentos y particularmente, el humo del cigarrillo. Además de su importancia en el metabolismo de los xenobióticos, CYP1A1, también está involucrado en el metabolismo endógeno compuestos, como ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, 17 $\beta$ -estradiol y melatonina. El ácido araquidónico y el ácido eicosapentaenoico se biotransforman por esta enzima a productos tales como 14, 15-epoxieicosatrienoico ácido y ácido 17, 18-epoxieicosatetraenoico, que influyen en la presión cardiovascular. Este atributo destacó la importancia de la asociación entre enfermedades del corazón y polimorfismos del CYP1A1. El tratamiento con el inhibidor de CYP1A,  $\alpha$ -naftoflavona, muestra que la actividad de CYP1A1 es importante para el adecuado desarrollo del sistema cardiovascular del embrión. Varios compuestos naturales y sintéticos han sido reportados como potentes inhibidores de las enzimas CYP1, como el resveratrol, quercetina y ácido rosmarínico (Paz y Miño, 2010; Santes Palacios et al., 2016; Williams et al., 2017)

Existen antecedentes que indican que la actividad y expresión de las enzimas que participan en la biotransformación de xenobióticos están alteradas en distintas patologías, ya sea producto de la enfermedad, o de su tratamiento. Aunque también se pueden presentar alteraciones en su actividad dadas por modificaciones genéticas del individuo lo cual implica cambios en la biotransformación de los xenobióticos (B. y T., 2004; Nebert y Dalton, 2006; Santiago et al., 2002).

La importancia de esta proteína en la carcinogénesis química inducida por PAH ha sido demostrado en ratones nulos para CYP1 (CYP1A1 y CYP1A2), en el que la falta de ésta muestra menos formación de aductos PAH-DNA, disminución del peso del hígado, los riñones y el corazón, así como la presión arterial y frecuencia cardíaca más baja en comparación con los ratones de tipo silvestre, lo que demuestra

la importancia de CYP1A1 en el sistema cardiovascular. Además, la exposición de roedores a los inhibidores CYP1A1 disminuyó el número de tumores inducidos por PAH. Los estudios epidemiológicos se centraron en la relación entre exposición de PAH, nivel de aductos de PAH-DNA e incidencia de cáncer, en los humanos se demuestra un mayor riesgo en el adenocarcinoma de colon, cáncer de mama y cáncer de pulmón en aquellos individuos con niveles más altos de aductos. Estos datos sugieren que el desequilibrio entre la desintoxicación, bioactivación de carcinógenos, catálisis enzimática, regulación de la expresión génica de CYP1A1 y el medio ambiente son factores cruciales en el proceso de carcinogénesis (Santes Palacios et al., 2016).

Estudios más específicos indican como en el caso del pollo que la exposición a los inductores de CYP1A1 causa aumento en el tamaño y peso del corazón; mientras que en los peces provoca edema en el pericardio, así como modificaciones en la forma normal del órgano. En la edad adulta, la expresión del CYP1A1 en humano es baja y se encuentra particularmente en los tejidos del sistema respiratorio tales como la tráquea y los pulmones, pero después de la inducción, también se detecta en otros órganos como el hígado, la glándula suprarrenal, la vejiga, el corazón, riñón, ovario, placenta, próstata, testículos, tiroides, glándula salival y bazo (Santes Palacios et al., 2016).

## Polimorfismos del CYP1A1

Los citocromos pueden ser derivados de algunas variantes alélicas, en los que generalmente una única base o un reducido número de bases del DNA para un gen con localización precisa en el genoma está cambiado, y, por consiguiente, la secuencia de aminoácidos (Teresa et al., 2004).

Polimorfismos genéticos, incluido el polimorfismo de nucleótido único (SNP), que afectan al metabolismo de xenobióticos pueden modular la susceptibilidad del individuo por exposición a contaminantes ambientales y el riesgo de desarrollar cáncer (Ghisari, Long y Bonefeld Jørgensen, 2013). Se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido en el gen CYP1A1, todos ellos localizados en el cromosoma 15q22. Estas variantes alélicas se indican con asterisco después del número y otro número posterior para identificar la variante, CYP2C9\*1, esta es la manera la más común, aunque también pueden nombrarse con una letra, como en el caso del CYP2D6; el cambio de un aminoácido y el codón involucrado, Ile462Val, entre otros (Bartsch et al., 2000; Teresa et al., 2004).

Del CYP1A1 existen al menos 15 alelos SNP que han sido validados. Algunos de los polimorfismos más estudiados son, el polimorfismo MspI (2A, m1, T3801C o rs4646903), que está ubicado en la región no codificadora de 3' del gen CYP1A1 y el polimorfismo Ile462Val (2C, m2 o rs1048943), el cual atañe la sustitución de una base de adenina a una de guanina en la región de unión al hemo del exón 7, dando como resultado la sustitución de un aminoácido de isoleucina por uno de valina en el codón 462 (Ile462Val). El alelo valina se correlaciona con aumento de la actividad enzimática, lo que sugiere una mayor susceptibilidad carcinogénica y en consecuencia, mayor riesgo de desarrollar cáncer (Aris, Shamsuddin y Praveena, 2014; Castaño Molina, Arango y Camargo, 2009; Fan, Huang, Xiao, Li y Ma, 2016; Manche, Jangala, Putta, Koralla y Akka, 2016; Paz y Miño, 2010; Teresa et al., 2004).

Específicamente, la variación Ile462Val en el gen CYP1A1 ha sido relacionada con diferentes tipos de patologías, puesto que el cambio de aminoácido genera un cambio en la actividad catalítica de la enzima, así como un incremento en los niveles de RNA mensajero y se ha relacionado con diferentes tipos de cáncer, como el de pulmón, de ovario y de mama, aunque para estos últimos existen resultados ambiguos con relación a la asociación con este tipo de cáncer (Paz y Miño, 2010). Los experimentos con animales han revelado un papel protector de inducción de CYP1A1 en la toxicidad de PAH, como en ratones nulos para CYP1A1 (Ghisari et al., 2013).

El SNP CYP1A1 Ile462Val está significativamente asociado con inducibilidad y mayor actividad de la enzima AHH (aril hidrocarburo hidroxilasa) que podría causar mayores tasas de activación de carcinógenos. Por lo tanto, individuos con la variante CYP1A1 gen (Val) pueden ser más susceptibles a los carcinógenos y pueden presentar más riesgos a la salud (Ghisari et al., 2013).

Un compuesto prototipo de esta activación de carcinógenos es el benzo a pireno, compuesto metabolizado mediante la vía de señalización del receptor de hidrocarburos arilo. Los efectos carcinogénicos pueden ser explicados por dos mecanismos: la vía genómica y la no genómica. La primera consiste en la inducción de genes que codifican enzimas que participan en la bioactivación del benzo a pireno; por ejemplo, la enzima CYP1A1 produce dioles epóxidos del benzo a pireno que son capaces de reaccionar con el DNA produciendo lesiones premutagénicas. El segundo mecanismo tiene que ver con la participación del AHR en la estimulación, promoción y progresión de tumores mediante la alteración de las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y del sistema inmune (Repetto, 1995; Vázquez et al., 2016).

Es importante señalar que a pesar de tener una gran cantidad de estudios sobre cáncer, no se ha logrado definir la participación que tienen ciertos polimorfismos sobre el desarrollo de la enfermedad, ya que, como podremos observar a continuación, se presentan contradicciones en cuanto a su intervención.

## Cáncer

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 2008 se diagnosticaron 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de personas murieron de cáncer, lo que representa un 13% de todas las defunciones a nivel mundial. En países desarrollados, la introducción de estrategias de detección precoz y las mejoras en la terapia contra el cáncer han permitido disminuir en algunos casos la incidencia de cáncer y además mejorar la sobrevida de los pacientes afectados. El cáncer es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos e incluso pueden migrar e invadir tejidos lejanos donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando metástasis que en muchas ocasiones es la causa de muerte de los individuos afectados (Vázquez et al., 2016).

El estudio de las células cancerosas tanto a nivel celular, molecular, metabólico y genético ha permitido mejorar de manera significativa el manejo de los distintos aspectos clínicos de esta enfermedad, proporcionando antecedentes que permitan predecir la sensibilidad a distintos tipos de terapia. Esto se ha traducido en la introducción de biomarcadores tumorales (moléculas que se expresan en niveles anormales en ciertos tipos de cáncer y pueden ser detectadas para diagnosticar o analizar la evolución de una enfermedad) y la identificación de potenciales blancos terapéuticos (Vázquez et al., 2016).

## Polimorfismo CYP1A1 Ile462Val en diversos tipos de cáncer

Como se describe anteriormente a pesar de que el CYP1A1 puede presentar diferentes polimorfismos, es de especial interés el Ile462Val por su alta frecuencia en algunas

poblaciones del mundo y a través de las investigaciones realizadas resulta además interesante identificar la participación que tiene en el desarrollo de cáncer.

Existen diversos estudios que relacionan el polimorfismo Ile462Val con diferentes tipos de cáncer como son: cáncer de endometrio, de pulmón, de esófago, de laringe, de cabeza y cuello, gástrico, de mamá y colorrectal principalmente, aunque también se presentan estudios en los cuales se demuestra un mayor riesgo de desarrollar carcinomas ováricos y prostáticos en pacientes turcos (Berber et al., 2013; Ghisari et al., 2013; J. Gil et al., 2014)

Los reportes actuales sugieren que los polimorfismos genéticos están relacionados con la variación individual en la susceptibilidad al cáncer. Dos polimorfismos han sido ampliamente estudiados, el primero es una mutación de T a C lo que causa la creación de un nuevo sitio de restricción MspI (MspI, m1, T6235C, rs4646903), el otro es un remplazo de isoleucina (Ile) por valina (Val), que es un sitio de unión a hemo (Ile462Val, m2, A4889G, rs1048943). Se han realizado estudios epidemiológicos para investigar la asociación entre los polimorfismos CYP1A1 y el riesgo de cáncer en humanos, sin embargo, las limitaciones de estudios individuales contribuyeron a conclusiones divergentes entre ellos, razón por la cual se deben ampliar estas investigaciones y concentrar las ya realizadas para obtener información más precisa. Este caso se centrará en el polimorfismo Ile462Val (Wu, et al., 2013).

Es por esto que a continuación se muestran algunos estudios que permiten identificar si el polimorfismo mencionado puede actuar como factor de riesgo o incluso como factor protector para diferentes tipos de cáncer. La tabla 1 contiene los estudios utilizados para la presente revisión.

**Tabla 1. Participación del polimorfismo Ile462Val en diversos tipos de cáncer**

<i>Enfermedad</i>	<i>Autor principal</i>	<i>Asociado</i>	<i>País o población</i>	<i>Datos relevantes adicionales</i>
Cáncer cervical	Ding, 2018.	Sí	Caucásica y asiática	Asiáticos no presentan asociación
Cáncer cervical	Wang, 2017.	Sí	Caucásica	Metanálisis
Cáncer cervical	Fan, 2015.	Sí	Caucásica y asiática	Metanálisis caucásicos no presentan asociación
Cáncer cervical	Rozzak, 2014.	Sí	Polonia	Riesgo en mujeres con antecedentes de tabaquismo y paridad
Cáncer de mama	García Martínez, 2017.	No	México	

*Continúa...*

<i>Enfermedad</i>	<i>Autor principal</i>	<i>Asociado</i>	<i>País o población</i>	<i>Datos relevantes adicionales</i>
Cáncer de mama	Verde, 2016.	Sí	Caucásica	Riesgo en mujeres fumadoras
Cáncer de mama	Paz y Miño, 2010.	No	Ecuador	
Linfoma difuso de células B grandes	Aldayel, 2008.	Sí	Arabia Saudita	
Cáncer colorrectal	Gil, 2016.	Sí	Polonia	
Cáncer colorrectal	Zhu, 2016.	Sí	Caucásica y asiática	Metanálisis
Hepatocarcinoma	Abohashem, 2016.	Sí	Egipto	Aumento en tamaño de tumores
Leiomioma uterino	Salimi, 2016.	No	Irán	
Leiomioma uterino	Wang, 2015.	Sí	Caucásica y asiática	Metanálisis
Cáncer de endometrio	Wang, 2012.	No	Caucásica y China	
Cáncer de vejiga	Berber, 2013.	No	Turquía	
Cáncer renal	Ahmad, 2013.	Sí	India	
Cáncer oral	Balaj, 2012.	No	India	

Elaboración propia.

A continuación se describen con mayor detalle cada uno de los estudios que involucran los padecimientos mencionados.

### *Cáncer cervical*

El cáncer de cuello uterino es la cuarta neoplasia maligna más frecuente en el mundo, causando aproximadamente 266 000 muertes por año en el mundo y en los últimos años la incidencia ha aumentado gradualmente en pacientes jóvenes. La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es un requisito previo para el cáncer de cuello uterino, además de algunos otros cofactores como la susceptibilidad genética, la sexualidad prematura, la paridad y el consumo de tabaco también pueden contribuir a la patogénesis del cáncer de cuello uterino (Bo Ding et al, 2018).

Ding y colaboradores (2018) publicaron un metanálisis con los siguientes criterios de inclusión: estudios de casos y controles de cáncer cérvico uterino con el polimorfismo CYP1A1 MspI o Ile462Val, casos patológicamente confirmados de cáncer de cuello

uterino y controles libres de cáncer, y estudios publicados con artículos de texto completo. Para cada estudio, se recopilaron las siguientes características: apellido del primer autor, año de publicación, país de origen, origen étnico, métodos de genotipado y tipo histológico tumoral. Los diferentes descendos étnicos se clasificaron como caucásicos y asiáticos. El resultado final fueron 15 estudios de los cuales 8 se relacionan con el polimorfismo Ile462Val, teniendo un total de 1466 casos y 1690 controles dando como resultado en la población caucásica, las personas con el alelo Val podrían tener un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino, mientras que en asiáticos no se encontró una correlación significativa.

Wang y sus colaboradores (2017) llevaron a cabo un metanálisis incorporando 11 estudios de casos y controles con 1.932 pacientes con cáncer cérvico uterino y 2.039 controles para el análisis estadístico, de estos once, cuatro de ellos fueron en población caucásica. Después de determinar los criterios de inclusión y exclusión se obtuvo de los estudios analizados una correlación del polimorfismo CYP1A1 Ile462Val con la susceptibilidad al cáncer cérvico uterino, adicional a esto se identificó que para la población caucásica el polimorfismo aumenta significativamente el riesgo de cáncer, lo que podría conducir a considerar la identificación del polimorfismo como factor predictor para cáncer cérvico uterino.

Un equipo de trabajo y Fan (2016) realizaron un metanálisis en el cual se tienen ocho estudios disponibles, incluyendo un total de 878 casos y controles de 1991. De estos ocho estudios cinco se realizaron en poblaciones asiáticas y los tres restantes en poblaciones caucásicas, utilizando cuatro métodos de genotipo que incluyen secuenciación de DNA, TaqMan, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de reacción de cadena de polimerasa (PCR-RFLP) y PCR de alelos específicos (AS-PCR) encontrando una asociación significativa entre el polimorfismo Ile462 Val y la endometriosis. Se realizó además un análisis de subgrupos de acuerdo a la etnia, encontrando para la población de origen asiático dicha asociación, la cual no se presenta en la población de origen caucásico. Aunque se indica también que el número de estudios realizados en caucásicos es muy pequeño, lo que induce a realizar mayor cantidad de estudios en estas poblaciones.

En 2014, Roszak menciona un estudio caso control en donde se incluyeron 456 mujeres con carcinoma cervical, determinado histológicamente, en un periodo que comprende entre abril de 2007 y diciembre de 2012, el grupo de control incluyó 285 mujeres sanas, tanto casos como controles fueron caucásicos, se genotipificaron

las muestras y se concluyó que el polimorfismo CYP1A1 Ile462Val puede ser un factor de riesgo para el cáncer de cuello uterino en mujeres con antecedentes positivos de tabaquismo y paridad. Se observó también que existe una asociación del polimorfismo y pacientes que indicaron el uso de anticonceptivos orales así como mujeres menopáusicas, y no se encontró relación con el estadio del tumor, tipo y grado histológico.

### *Cáncer de mama*

A nivel mundial, el cáncer de mama es un importante problema de salud, ocupa el primer lugar en incidencias por neoplasias y el segundo en mortalidad después del cáncer de pulmón en mujeres en los Estados Unidos. En México es el cáncer femenino más común con alrededor de 20 000 casos nuevos por año. La edad en el diagnóstico de cáncer de mama difiere significativamente entre los países menos desarrollados, estas diferencias entre países también pueden ser el resultado de diferencias en la exposición a los factores de riesgo ambiental, reproductivo y genético de cáncer de mama (García Martínez et al., 2017; Paz y Miño, 2010).

García Martínez y otros investigadores, en 2017, realizan un estudio caso control, incluyendo 952 mujeres mexicanas con cáncer de mama y 998 controles de 2007 a 2011, genotifican el gen CYP1A1 Ile462Val y que existe un riesgo aumentado por nuliparidad, edad avanzada al primer embarazo completo, antecedentes familiares de primer grado para tabaco y alcohol, pero a pesar de la evidencia biológica que relaciona al CYP1A1 con la formación de metabolitos cancerígenos no encuentran asociación con riesgo de cáncer de mama, pero se evidencia el hecho de que el polimorfismo se encuentra asociado en mujeres mexicanas, no así en mujeres estadounidenses.

Verde (2016) evaluó los genotipos presentados en 297 mujeres caucásicas (españolas) con un promedio de edad de 54 años, dividida en tres grupos: a) 66 pacientes que nunca habían fumado y que presentaban cáncer de mama verificado; b) 141 pacientes fumadoras y que presentaban cáncer de mama verificado; c) 83 pacientes fumadoras saludables con antecedentes familiares o personales negativos y son hallazgos mamarios. Después de comparar los resultados de los grupos se concluyó que el genotipo CYP1A1 Ile462Ile se asocia significativamente con un mayor riesgo de cáncer de mama en mujeres fumadoras.

Paz y Miño y su equipo (2010) evalúan la participación del CYP1A1 Ile462Val en 173 mujeres ecuatorianas (82 casos y 91 controles), de los 82 casos 61 fueron diagnosticados como carcinoma ductal infiltrante, los 21 casos restantes comprenden un diagnóstico con un componente invasor o metastásico. Se identifican los genotipos y se observa que no existe asociación del polimorfismo con riesgo de cáncer de mama en pacientes ecuatorianas para los genotipos Ile/Val o Val/Val, esto concuerda con estudios realizados en poblaciones caucásicas. Adicionalmente se ha determinado que el estudio de este polimorfismo ha permitido analizar que es un biomarcador molecular diferente en población ecuatoriana con cáncer de mama debido a la frecuencia y riesgo no significativo, a diferencia de otros polimorfismos estudiados en cáncer de próstata, vejiga y pulmón.

### *Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)*

Es una neoplasia maligna frecuente a nivel mundial, que tiene una alta incidencia y prevalencia entre las diversas neoplasias, de hecho, la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) en su proyecto GLOBOCAN 2012 la ubica dentro de las diez neoplasias más frecuentes en todo el mundo, con un rango que varía entre las diversas regiones geográficas (séptimo lugar para América del Norte y octavo para América del Sur). Es la neoplasia linfocítica más frecuente en adultos, correspondiendo a un 30-40% de todos los linfomas no Hodgkin a nivel mundial y un 60-65% de los linfomas no Hodgkin de células B (Al-Dayel et al., 2008; Castañeda Ruiz, Via y Rada, Serra Jaramillo, Paz Cornejo y Salas Sánchez, 2017).

En 2018, Al-Dayel y colaboradores efectuaron un estudio con 182 pacientes diagnosticados del Departamento de Patología del Hospital Especializado y Centro de Investigación King Faisal (KFSHRC) utilizando los criterios definidos de la Clasificación Europeo Americana de neoplasias linfocíticas. Los datos clínicos estaban disponibles para 179 de los 182 pacientes reclutados que comprendían 107 varones y 72 mujeres con una edad media de 49 años. Se seleccionó aleatoriamente un grupo control de la población general a partir del DNA disponible en el Banco Institucional de Biorepositivos Tissue en KFSHRC. El DNA se extrajo de tejidos del linfoma embebidos en parafina, los resultados muestran que el alelo CYP1A1\*2C se asocia con una actividad enzimática elevada en linfocitos humanos cultivados, lo que respalda la hipótesis que relaciona el riesgo de DLBCL con la inducibilidad de la enzima.

### *Cáncer colorrectal*

El cáncer colorrectal (CCR) es causado por factores externos (como el tabaco, los organismos infecciosos, una dieta poco saludable) y por factores internos (mutaciones genéticas, hormonales y condiciones inmunológicas). El CCR se consideraba una enfermedad de los adultos mayores, pero en la actualidad se observa un incremento en la incidencia en el grupo de edad más joven (Burbano Luna et al., 2016).

Gil e investigadores, en 2014, establecieron un estudio de cohorte, que tuvo como objetivo evaluar el papel del polimorfismo CYP1A1 Ile462Val como factor de riesgo para cáncer colorectal en pacientes polacos, teniendo 478 pacientes y 404 controles, los resultados indican una importante influencia del género para la susceptibilidad general del CCR, aunque también se presentan factores como la edad, enfermedades inflamatorias intestinales, antecedentes familiares, susceptibilidad modulada por baja frecuencia de polimorfismos genéricos y factores externos como la dieta y el estilo de vida. En conclusión, se identifica una asociación entre el polimorfismo y el riesgo de cáncer colorrectal en pacientes mayores de 50 años del sexo femenino.

Se llevo a cabo un metanálisis (Zhu et al., 2016), incluyendo 20 estudios con 8665 casos y 9953 controles en rs1048943 A>G, los estudios se obtuvieron de los siguiente sitios PubMed, Web de conocimiento, Embase, la base de datos de China Infraestructura Nacional de Conocimiento (CNKI) y VIP, los idiomas fueron limitados a inglés y chino. Los criterios de selección fueron: estudios caso control, que indicaran asociaciones entre CYP1A1 rs1048943 A>G o rs4646903 T>C y cáncer colorrectal, que utilizaran genotipos y con datos poblacionales completos, no se tomaron en cuenta artículos de revisión, informes de conferencias. Luego de analizar toda la información, el metanálisis demostró que el polimorfismo CYP1A1 rs1048943 A>G puede aumenta la susceptibilidad a CRC, esta conclusión sugiere que CYP1A1 puede contribuir en su patogénesis.

### *Cáncer de pulmón*

El cáncer de pulmón es el más frecuente y el que mayor mortalidad ocasiona en el mundo, desarrollado principalmente en adultos mayores. Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de pulmón agrupa todos los tumores primitivos

epiteliales malignos del pulmón excluyendo los tumores pleomórficos, sarcomatoide, carcinoide y los derivados de las glándulas salivares, la suma de muerte por cáncer de colon, próstata y mama supera los anteriores. En el momento del diagnóstico más del 40% de los pacientes tienen una enfermedad localmente avanzada, en la que las posibilidades de curación son escasas y la supervivencia a los cinco años es de apenas el 15% (Acosta Reynoso, Remón Rodríguez, Segura Peña y Carralero Rivas, 2016). En México durante el 2008 en mujeres, el cáncer de pulmón ocupó el lugar décimo sexto con 2255 defunciones y se identifica que ocurre mayormente en fumadores (Onofre Borja y Reding Bernal, 2013).

Chen (2011) elaboró un metanálisis tomando en cuenta los siguientes criterios: documentos originales que contienen datos independientes, casos de cáncer de pulmón confirmados histológicamente o patológicamente, estudios de casos y controles o de cohortes, información de distribución de genotipos en casos y controles *odds ratio* con intervalo de confianza del 95% y valor P. Para el polimorfismo de Ile462Val se incluyeron 47 estudios con un total 8920 casos y 12 540 controles. De los casos, el 32% eran asiáticos orientales, el 44% eran caucásicos y el 24% eran de otros orígenes étnicos. Se tiene para este polimorfismo una asociación con cáncer de pulmón en los asiáticos, pero no se pudo detectar ninguna asociación con el riesgo de cáncer para caucásicos y otras poblaciones.

Otro metanálisis efectuado fue en 2011 por Wang, utilizando 28 estudios en diferentes poblaciones, 5 estudios en africanos, 12 estudios en asiáticos, 8 en caucásicos y 12 en otras poblaciones, con un total de 5126 pacientes con cáncer de pulmón y 6974 controles. Los criterios de inclusión fueron, estudios de casos y controles, frecuencia de genotipo disponible, distribución de genes de los grupos control en equilibrio Hardy-Weinberg, conjunto completo de datos, estudios del polimorfismo CYP1A1 Ile462Val y cáncer de pulmón. Para estudios que incluyen diferentes grupos étnicos, los datos se extrajeron por separado. Los resultado indican una asociación significativa para el polimorfismo Ile462Val con el riesgo de cáncer para asiáticos, no así en el caso de africanos, caucásicos u otras poblaciones.

### *Hepatocarcinoma*

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia primaria de hígado más frecuente. En los últimos años se ha constatado un aumento progresivo de su incidencia en países industrializados y actualmente constituye la sexta neoplasia más frecuente, con más de medio millón de nuevos casos al año, la tercera causa de muerte por cáncer y la principal causa de muerte en pacientes cirróticos. Su distribución mundial es muy heterogénea y existen factores de riesgo como la hepatitis B y C crónica, el consumo de alcohol, el sexo, la obesidad y algunos químicos como la aflatoxina (Abo Hashem et al., 2016; Vilana, Forner, Garca, Ayuso y Bru, 2010).

Abo-Hashem (2016) realizó un estudio en 40 pacientes con CHC y 40 pacientes con cirrosis. Los pacientes fueron reclutados del Departamento de Medicina Tropical, del Hospital de Mansoura University entre marzo de 2013 y agosto de 2014. Cuarenta sujetos de control se incluyeron en el estudio. Para todos los casos y controles se elaboró el historial clínico y examen médico completo, se identificó además a pacientes con antecedentes de tabaquismo, consumo de alcohol, y síntomas de enfermedad hepática. Se tomaron muestras de sangre venosa y se separó el suero para la detección de marcadores séricos de VHB, anticuerpos para virus de la hepatitis C, perfil hepático y alfa fetoproteína. Los genotipos se determinaron de sangre completa. Se encontró que las frecuencias del genotipo Ile/Val y el alelo Val son más comunes entre los pacientes con CHC (37.5 y 23.8%) que en los pacientes cirróticos (15 y 10%). Se identificó también que este polimorfismo se encuentra involucrado en el desarrollo de tumores, ya que en pacientes con el polimorfismo se presentan tumores de mayor tamaño en relación con pacientes que no presentan dicho polimorfismo.

### *Leiomioma uterino*

El leiomioma uterino (LU) es el tumor benigno de músculo liso más común, los síntomas uterinos de alta prevalencia incluyen hemorragia vaginal anormal y dolor pélvico. Durante los años reproductivos de las mujeres, la incidencia estimada es del 30 al 40%. Se ha demostrado la importancia de las hormonas sexuales en el desarrollo y proliferación de LU pero también se debe considerar la asociación de factores como la etnia, la edad, el consumo de cafeína, la paridad y el embarazo con el riesgo de

leiomioma uterino (Barão et al., 2010; Salimi, Sajadian, Khodamian, Yazdi, y Rezaee, n.d.; F. Wang, Chen, Wang, Ma, y Mayinuer, 2015).

Salimi, en el 2015, llevó a cabo en Irán un estudio caso control en 105 pacientes con LU (en la etapa anterior a la menopausia con leiomioma) y 112 mujeres sanas en su etapa premenopáusica se seleccionaron como el grupo de control. Se genotipificaron las muestras y se observó que no existe asociación significativa con la edad, intervalos de menstruación, índice de masa corporal, edad de la menarquía entre las mujeres con LU y controles, pero la frecuencia de sangrado y el dolor fue significativamente mayor en la mujeres con LU. En cuanto al polimorfismo Ile462Val no mostro asociación con cáncer, pero cuando se presenta además el polimorfismo Asp449Asp el riesgo de cáncer se podría incrementar.

Wang y sus colaboradores (2015) efectuaron un metanálisis en el que incluyeron 9 estudios en chino e inglés de casos y controles (en seis de ellos se evalúa el polimorfismo CYP1A1 Ile462Val con 1754 casos y 1689 controles), desde 2006 hasta 2014 con un total de 2157 casos de LU y 2197 controles sanos; cuatro estudios se efectuaron con población caucásica y cinco en población asiática. De estos estudios seis relacionan el polimorfismo Ile462Val con el riesgo de LU, se encontró además que los asiáticos y caucásicos con el polimorfismo mostraron un mayor riesgo de LU.

### *Cáncer de vejiga*

El cáncer vesical es la segunda malignidad más común del tracto urinario y la novena a nivel mundial, con 357 000 nuevos casos y 145 000 muertes a nivel mundial por año. En Latinoamérica presenta una incidencia de 5.6 por cada 100 000 habitantes por año. En México, se encuentra en el cuarto lugar de presentación, con el 14.4% de los tumores diagnosticados detrás del cáncer de próstata, testículo y riñón y con una relación hombre: mujer de 3.8:13 (De la Rosa Cisneros et al., 2015).

Berber (2013) realiza un estudio en pacientes turcos con cáncer de vejiga, se obtienen datos clínicos y demográficos que incluyen el sexo, la edad, el tabaquismo, la etapa patológica del tumor y los grados tumorales. En el estudio se analizan los genotipos de 114 pacientes con cáncer diagnosticado histológicamente (103 hombres y 11 mujeres) excluyendo pacientes que presentaran cáncer en otra región del cuerpo y 114 controles (103 hombres y 11 mujeres) para el polimorfismo CYP1A1 Ile462Val,

se consideraron datos clínicos y demográficos como edad, tabaquismo y estadio del tumor patológico. Luego de analizar los resultados, estos indican que no existe asociación entre el polimorfismo y el riesgo de cáncer.

### *Cáncer de endometrio*

El cáncer de endometrio es uno de los más frecuentes a nivel mundial ubicándose en el cuarto lugar de mortalidad, después del cáncer de mama, cuello uterino y ovario. Lamentablemente su incidencia va en aumento, asociado a los cambios epidemiológicos y medioambientales que afectan a la población femenina. La dieta, el tabaco, el consumo de alcohol, las infecciones, la obesidad, los agentes contaminantes y la exposición a radiaciones influyen profundamente en el desarrollo de neoplasias, y se ha demostrado que prevenir la exposición a agentes cancerígenos ambientales tiene gran impacto en la incidencia de cáncer. Comprende un grupo heterogéneo de tumores con distintos factores de riesgo, presentación clínica, características histopatológicas y moleculares (Lien y Cabrera, 2015).

En 2012, Wang y su equipo realizaron un metanálisis con el propósito de estimar con precisión la asociación entre el polimorfismo CYP1A1 Ile462Val y el riesgo de cáncer de endometrio. Se incluyeron en total 7 estudios con 1286 casos y 2111, seis en población caucásica y uno para población china. Después de la evaluación genotípica no se tuvo evidencia de asociación significativa entre el polimorfismo CYP1A1 Ile462Val y el riesgo de cáncer endometrial.

### *Cáncer renal*

El carcinoma de células renales (CCR) es la octava neoplasia maligna más frecuente en el adulto y la neoplasia renal más frecuente, lo que representa, aproximadamente, el 90% de las neoplasias malignas renales. Es una enfermedad heterogénea, con múltiples subtipos que tienen diferentes expresiones clínicas, anatomopatológicas y citogenéticas, y distintas respuestas terapéuticas. El carcinoma de células claras es el subtipo más frecuente (65-70%), seguido por los subtipos papilar (15-20%), cromóforo (6-11%) y otros subtipos (5%) como los síndromes de cáncer renal hereditario y otros menores (Bazan y Busto, 2014).

Un grupo de investigadores y Ahmad (2013) realizaron un estudio con un total de 196 (138 hombres y 58 mujeres) recientemente diagnosticados con CCR de la población del norte de la India (de los estados de Delhi y estados limítrofes) registrados en el Departamento de Urología, del Instituto de Ciencias Médicas de la India (AIIMS), Nueva Delhi. Los pacientes fueron reclutados después del diagnóstico radiológico e histológico del carcinoma de células renales. El grupo control incluyó 250 voluntarios sanos (172 hombres y 78 mujeres), elegidos al mismo tiempo, que eran libre de enfermedades crónicas, sin historial de ninguna cáncer y viviendo en la misma área geográfica. Se realizó el genotipificado a partir de sangre periférica de todos los pacientes y controles. Los resultados muestran que el genotipo CYP1A1 AG tenía significativamente mayor riesgo de desarrollar CCR que CYP1A1 AA genotipo, del mismo modo, el genotipo CYP1A1 GG tenía incluso significativamente mayor riesgo de desarrollar CCR que CYP1A1 Genotipo AA, lo que puede indicar que la población pudo haber estado expuesta a diferentes agentes ambientales, que luego de la biotransformación por CYP1A1, pueden producir sustancias cancerígenas que conducen al desarrollo de cáncer de células renales.

### *Cáncer oral*

El carcinoma de células escamosas (CCC) es un problema de salud global significativo con tasas de incidencia y mortalidad crecientes. Anualmente, aproximadamente 500 000 pacientes son diagnosticados con cáncer oral en todo el mundo. El tabaquismo es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer oral y el consumo de alcohol aumenta aún más el riesgo junto con el cáncer de laringe y esófago (Balaji, Singh y Bhaskar, 2012).

Balaji (2012) realizó un estudio en el cual se obtuvieron muestras de sangre de 157 pacientes con cáncer oral que recibían atención en el hospital de cáncer de Kanchipuram en la India. La edad media fue de  $55.07 \pm 10.59$  años e incluyó al 54.8% de los hombres. El diagnóstico del cáncer oral como carcinoma de células escamosas se confirmó histopatológicamente. Los donantes anónimos, sin antecedentes personales de cáncer de ningún órgano y que formaron el grupo de control de sujetos, fueron reclutados del Colegio Médico Sri Ramachandra. Para los casos y controles, la información con respecto a la edad, sexo, ocupación, tabaquismo y alcoholismo

se obtuvo a través de un cuestionario. Se extrajo DNA de todos los pacientes y se determinaron los genotipos, después del análisis de resultados se encontró que no hubo diferencias significativas entre los controles y los pacientes con cáncer oral, relacionando el polimorfismo Ile462Val.

Adicional a esto, se identificaron otros metanálisis diferentes a los mencionados anteriormente como complemento, mismos que se muestran en la tabla 2, y que nos permiten reafirmar que la cantidad de estudios realizados hasta la fecha proporciona información de suma importancia pero que no es concluyente, lo que lleva a considerar la realización de una mayor cantidad de estudios experimentales y documentales para esclarecer la participación del polimorfismo Ile462Val y el desarrollo de diversos tipos de cáncer.

Tabla 2. Metanálisis para CYP1A1 Ile462Val

<i>Autor principal</i>	<i>Tipo de cáncer</i>	<i>Casos</i>	<i>Controles</i>	<i>País o población</i>	<i>Asociación</i>	<i>Asociación con fumadores</i>
Meng, 2015	Cáncer renal	742	975	Asiática	No	Sí
Ji, 2012	Cáncer de pulmón	9491	13725	Mixta	Sí	Sí
Gong, 2014	Cáncer de esófago	2552	3613	Asiática y caucásica	Sí	No hay datos
Liu, 2014	Cáncer de tracto digestivo	3790	4907	Asiática	Sí	No hay datos
Liu, 2015	Cáncer oral	1527	2374	Mixta	Sí	No hay datos

Elaboración propia.

Como podemos observar con los datos de la tabla 2, se tiene que entre mayor sea el número de participantes se identifica la asociación entre el polimorfismo y el riesgo de cáncer, un factor clave en estas observaciones consiste en resaltar que las principales asociaciones se encontraron en la población asiática, lo cual nos proporciona datos que podrían relacionarse con la incidencia de cáncer en determinadas regiones del mundo (Chen et al., 2011; Gong et al., 2014; Ji, Wang y Suo, 2012; Liu, Jiang, Deng y Zhao, 2014; H. Liu, Jia, Mao y Lin, 2015; Meng, Ma, Sui, Tian y Jiang, 2015).

En general, la mayoría de los estudios aquí analizados muestran una asociación entre el polimorfismo y la enfermedad, pero se debe notar que existen otros que no muestran asociación, lo que nos lleva a resaltar las diferencias que podrían evidenciar estos resultados, entre ellas tenemos, el tipo de población utilizada y la región geográfica de la cual provienen, la cantidad de individuos participantes, y las

condiciones socioeconómicas y medioambientales a las cuales están expuestos. Para el caso de los metanálisis los criterios de inclusión y exclusión designados en cada uno (Abo-Hashem et al., 2016; Al-Dayel et al., 2008; Aris et al., 2014; Balaji et al., 2012; Berber et al., 2013; Bo Ding et al., 2018; Chen et al., 2011; Fan et al., 2016; García Martínez et al., 2017; J. Gil et al., 2014; Gong et al., 2014; Ji et al., 2012; Liu et al., 2014; Liu et al., 2015; Meng et al., 2015; Paz y Miño, 2010; Roszak, Lianeri, Sowińska y Jagodziński, 2014; Salimi et al., 2015; Verde et al., 2016; Wang et al., 2015; Wang et al., 2011; Wang et al., 2017; Zhu et al., 2016).

Derivado de los estudios realizados para esclarecer mecanismos de respuesta a xenobióticos y etiología de enfermedades se pueden identificar sustancias que pueden actuar como protectores. Abdull et al., en 2015, estudian el efecto del fenetil isotiocianato y en base a los resultados obtenidos propone una estrategia que podría servir como quimioprevención para el cáncer, esto es, el fenetil isocianato aumenta la proteína CYP1A1 y disminuye la actividad enzimática de CYP1A1, dicho efecto se comprobó al observar la inhibición contra benzo a pireno, concluyendo que el fenetil isocianato inhibe la bioactivación del benzo a pireno lo que modula la expresión del CYP1A1 y relacionando este efecto con lo reportado hasta la actualidad se puede sugerir que moléculas con potencial inhibitorio para genes asociados a enfermedades podrían actuar como factores de protección.

Además, una asociación establecida entre la modulación del citocromo P450 1A1 y el cáncer se ha descrito en múltiples estudios y ya que la mayor síntesis de proteína del citocromo P450 se produce tras la exposición duradera a un agente inductor que incrementa la transcripción génica, por tanto, es mayor el resultado de un aumento en la síntesis de enzimas microsomales que un cambio en la actividad de la enzima existente por un efecto alostérico. La inducción del enzima provoca un aumento de la tasa de biotransformación y una disminución, por tanto, de la disponibilidad o actividad del compuesto original, como consecuencia, puede aumentar o disminuir la toxicidad farmacológica. Los inductores, por lo general muestran especificidad por una familia particular del citocromo P450, a pesar de que dentro de ella, sustancias con estructuras químicas diferentes pueden tener efectos similares, de ahí la importancia de evaluar los polimorfismos más frecuentes de los genes involucrados. En específico para el CYP1A1, este tipo de inductores se fija al receptor aril hidrocarburo (AhR) citosólico, y el complejo formado es transportado por un traslocador nuclear (RNAt) hasta el núcleo donde actúa como factor de transcripción, para regular en dirección

ascendente la expresión de CYP1A1. Además, estos inductores del citocromo P450 aumentan de manera simultánea la expresión de enzimas que intervienen en biotransformaciones de la fase II (Villar, 2004).

El receptor para aril hidrocarburo, AhR, es un factor de transcripción que pertenece a la familia de receptores hormonales y se considera como el principal receptor de proteína que influye en la inducción del CYP1A1. El AHR es un factor de transcripción asociado con dos proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90), una proteína asociada al virus de la hepatitis B X (XAP2) y una proteína chaperona de 23 kDa (p23). Este receptor es activado por ligandos endógenos y varios xenobióticos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (los PAH son ligandos de AhR pero también actúan como sustratos para las enzimas CYP1A1 y CYP1B1), heterocíclicos, aminas y bifenilos halogenados. Después de la activación del ligando, el AHR sufre cambios conformacionales que promueven su translocación al núcleo, donde se disocia de las proteínas chaperonas (Hsp90, XAP2, y p23), y se une al translocador nuclear RNAT; entonces, el complejo formado AHR-RNAT se une a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE). Esto resulta en una mayor expresión del CYP1A1 (Horley et al., 2017; Santes Palacios et al., 2016; Sinal, Webb y Bend, 1999).

Tomando en consideración este mecanismo del AHR se han descrito mecanismos de regulación a la baja; por ejemplo, la proteína represora AHR (AHRR) es un gen objetivo de la actividad transcripcional de AHR, y él compite por vincularse con elementos de respuesta a xenobioticos. AHRR ha sido descrito como un regulador negativo específico de la expresión de CYP1A1. El factor inducible por hipoxia participa como un regulador negativo de la expresión de CYP1A1, a través de la competencia con AHR para la unión a RNAT (Santes Palacios et al., 2016).

Se debería considerar la evaluación de los efectos que tienen las sustancias mencionadas anteriormente y las respuestas de cada individuo que presenta el polimorfismo Ile462Val, ya que por todo lo anterior, se podría asumir que la administración de estas sustancias, conseguiría regular la elevada actividad enzimática que observamos en presencia del polimorfismo (Horley et al., 2017; Santes Palacios et al., 2016; Sinal et al., 1999).

## CONCLUSIÓN

El polimorfismo Ile462Val se presenta frecuentemente en los individuos sin importar el tipo de población a la que pertenezcan, lo que conduce a buscar alternativas que pudieran explicar la incidencia de cáncer y la presencia de polimorfismos; una sugerencia a evaluar sería determinar la frecuencia del polimorfismo en poblaciones que se encuentran en zonas geográficas reportadas con altos índices de contaminación, e incluso ser más específicos y determinar que contaminantes emergentes se encuentran presentes en esta zona y si existe alguna relación con la presencia del polimorfismo Ile462Val.

La presencia del polimorfismo Ile462Val proporciona indicios de una mayor actividad enzimática y como mencionamos anteriormente este incremento en la actividad pudiera estar vinculado con el contacto a contaminantes emergentes y sus metabolitos, por lo tanto, podemos sugerir que dicho polimorfismo actuaría como factor de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer y un sin número de enfermedades, o bien como un indicador para el desarrollo de las mismas.

Todo lo anterior podría derivar en la necesidad inherente de proponer diagnósticos basados en terapia génica individualizada, brindando atención en etapas tempranas y proporcionando tratamientos efectivos.

## REFERENCIAS

- Abo-Hashem, E. M.; El-Emshaty, W. M.; Farag, R. E. S.; Zakaria, S.; Abd El-Aziz, M. y Ghonaim, A., 2016. Genetic Polymorphisms of Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) and Risk of Hepatocellular Carcinoma Among Chronic Hepatitis C Patients in Egypt. *Biochemical Genetics* [en línea], 54 ( 5), 696-713. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10528-016-9749-6>
- Acosta Reynoso, I. M.; Remón Rodríguez, L.; Segura Peña, R. y Carralero Rivas, Á., 2016. Factores de riesgo en el cáncer de pulmón TT-Risk Factors in the Lung Cancer. *CCH, Correo Cient. Holguín* [en línea], 20 (1), 42-55. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1560-43812016000100005&lng=es&synrm=1&isoytng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100005&lng=es&synrm=1&isoytng=es)
- Al-Dayel, F.; Al-Rasheed, M.; Ibrahim, M.; Bu, R.; Bavi, P.; Abubaker, J.; ... Al-Kuraya, K., 2008. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP1A1, GSTT and GSTP con-

- tribute to the development of diffuse large B-cell lymphoma risk in the Saudi Arabian population. *Leukemia and Lymphoma* [en línea], 49 (1), 122-129. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10428190701704605>
- Alan, M. V.; Barber, L. B.; Gray, J. L.; Lopez, E. M.; Woodling, J. D. y Norris, D. O., 2008. Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environmental Science and Technology* [en línea], 42 (9), 3407-3414. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es0720661>
- Aris, A. Z.; Shamsuddin, A. S. y Praveena, S. M., 2014. Occurrence of 17 -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review. *Environment International* [en línea], 69, 104-119. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>
- B, M. O. y T., V. G., 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías, *Revista médica de Chile* [en línea], 85-94. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0034-98872004000100014>
- Badal, S. y Delgoda, R., 2014. Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *Journal of Applied Toxicology* [en línea], 34 (7), 743-753. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jat.2968>
- Balaji, L.; Singh, K. B. y Bhaskar, L. V. K. S., 2012. CYP1A1 genotypes and haplotypes and risk of oral cancer: A case-control study in South Indians. *Biosystems*, 412, 407-412.
- Barão, M. A.; Oliveira, E.; Vieira Gomes, M. T.; Cotrim Guerreiro Da Silva, I. D.; Ferreira Sartori, M. G.; Batista Castello Girão, M. J. y De Aquino Castro, R., 2010. The role of MSP i CYP1A1 gene polymorphism in the development of uterine fibroids. *Fertility and Sterility* [en línea], 94 (7), 2783-2785. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.05.034>
- Bartsch, H.; Nair, U.; Risch, A.; Rojas, M.; Wikman, H. y Alexandrov, K., 2000. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9 (1), 3-28.
- Bazan, F. y Busto, M. (2014). Radiología del carcinoma renal. *Radiología* [en línea], 56 (1), 61-75. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rx.2013.08.005>
- Becerril Bravo, J. E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Univer-sitaria* [en línea], 10 (8), 1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.2225/vol14-issue6-fulltext-8>
- Berber, U.; Yilmaz, I.; Yilmaz, O.; Haholu, A.; Ates, F.; Demirel, D.; ... Frqàghqfh, R. I., 2013. CYP1A1 (Ile462Val), CYP1B1 (Ala119Ser and Val432Leu), GSTM1 (null), and GSTT1 (null) Polymorphisms and Bladder Cancer 5LVN LQ D 7XUNLVK 3RSXODWLRQ, 1, 3-7.

- Bo, Ding; Sun, W.; Han, S.; Cai, Y.; Ren, M. y Shen, Y., 2018. Cytochrome P450 1A1 Gene Polymorphisms and Cervical Cancer Risk. A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Gynecological Cancer* [en línea], 21 (2), 323-331. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31820575c0>
- Burbano Luna, D. F.; Manrique, M. A.; Chávez García, M. Á.; Pérez Corona, T.; Hernández Velázquez, N. N.; Escandón Espinoza, Y. M.; ... Cerna Cardona, J., 2016. Epidemiología del cáncer colorrectal en menores de 50 años en el Hospital Juárez de México. *Endoscopia* [en línea], 28(4), 160-165. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.endomx.2016.10.008>
- Calderón Preciado, D.; Matamoros, V. y Bayona, J. M., 2011. Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Science of the Total Environment* [en línea], (412-413), 14-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.057>
- Castañeda Ruiz, P.; Via y Rada, F.; Serra Jaramillo, R.; Paz Cornejo, E. y Salas Sánchez, F., 2017. Linfoma difuso de células B grandes: ¿una sola enfermedad? *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [en línea], 34 (3), 551. Disponible en: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2803>
- Castaño Molina, E.; Arango, L. y Camargo, M., 2009. CYP1A1, CYP2E1 and Gastric Cancer Risk In A High-Incidence Colombian Population. *Acta Biol Colomb* [en línea], 14 (3), 203-215. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v14n3/v14n3a16.pdf>
- Cederbaum, A. I., 2006. Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* [en línea], 21 (3), 22-25. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04595.x>
- Chen, Z.; Li, Z.; Niu, X.; Ye, X.; Yu, Y.; Lu, S. y Chen, Z., 2011. The effect of CYP1A1 polymorphisms on the risk of lung cancer: A global meta-analysis based on 71 case-control studies. *Mutagenesis* [en línea], 26 (3), 437-446. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/ger002>
- Chilo, N. H., 1999. El citocromo P450 y su rol en la hepatotoxicidad inducida por drogas. *Enfermedades del aparato digestivo*, 2 (2), 34-37.
- Coutiño Rodríguez, Elda Maria del Rocío y P. H. C., Antonio Purata, 2010. Citocromo P450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico-carcinogénico, 31 (2), 60-71.
- De la Rosa Cisneros, A. R.; Viveros Contreras, C.; Torres Aguilar, J.; Hernández León, O.; Arellano Cuadros, R. y Martínez Carrillo, G., 2015. Experiencia en el tratamiento de cáncer vesical. *Revista Mexicana de Urología* [en línea], 75 (2), 58-63. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.uromx.2015.01.001>

- Elizondo, G., 2004. Uso de ratones modificados genéticamente para el estudio de la funcionalidad y regulación del CYP450. Aplicaciones en farmacología y toxicología. *Mensaje Bioquímico*, XXVIII, 103-119.
- Fan, W.; Huang, Z.; Xiao, Z.; Li, S. y Ma, Q., 2016. The cytochrome P4501A1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [en línea], 33 (10), 1373-1383. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0783-4>
- Freeman, J. E.; Stirling, D.; Russell, A. L. y Wolf, C. R. , 1992. cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse Cyp2e1. *Biochem J* [en línea], 281 (Pt 3), 689-695. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1536649](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1536649)
- García Martínez, A.; Gamboa Loira, B.; Tejero, M. E.; Sierra Santoyo, A.; Cebrián, M. E. y López Carrillo, L., 2017. CYP1A1, CYP1B1, GSTM1 and GSTT1 genetic variants and breast cancer risk in Mexican women. *Salud Publica de Mexico* [en línea], 59 (5), 540-547. Disponible en: <https://doi.org/10.21149/8527>
- Ghisari, M.; Long, M. y Bonefeld Jørgensen, E. C., 2013. Genetic polymorphisms in CYP1A1, CYP1B1 and COMT genes in Greenlandic Inuit and Europeans, *International Journal of Circumpolar Health* [en línea], 72 (1), 1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.3402/ijch.v72i0.21113>
- Gil, J.; Gaj, P.; Misiak, B.; Ostrowski, J.; Karpinski, P.; Jarczyńska, A.; ... Sasiadek, M. M., 2014. CYP1A1 Ile462Val polymorphism and colorectal cancer risk in Polish patients. *Medical Oncology* [en línea], 31 (7), 2-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0072-y>
- Gil, M. J.; Soto, A.; Usma; J. I. y Gutiérrez, O. D., 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Contaminantes Emergentes*, 7 (2), 52-73.
- Gong, F. F.; Lu, S. S.; Hu, C. Y.; Qian, Z. Z.; Feng, F.; Wu, Y. L., ... Sun, Y. H., 2014. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphism and susceptibility to esophageal cancer: an updated meta-analysis of 27 studies. *Tumor Biology* [en línea], 35 (10), 10351-10361. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2341-y>
- Horley, N. J.; Beresford, K. J. M.; Kaduskar, S.; Joshi, P.; McCann, G. J. P.; Ruparelia, K. C.; ... Chaudhuri, B., 2017. (E)-3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one, a heterocyclic chalcone is a potent and selective CYP1A1 inhibitor and cancer chemopreventive agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [en línea], 27 (24), 5409-5414. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.009>

- Ji, Y. N.; Wang, Q. y Suo, L. Jun., 2012. CYP1A1 Ile462Val Polymorphism Contributes to Lung Cancer Susceptibility among Lung Squamous Carcinoma and Smokers: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* [en línea], 7 (8). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043397>
- Lien, T. T. G. y Cabrera, M. P. C., 2015. Epidemiología del cáncer de endometrio Epidemiology of endometrial cancer. *Obstetricia y Ginecología* [en línea], 41 (3), 252-265. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=65997>
- Liu, C.; Jiang, Z.; Deng, Q. y Zhao, Y., 2014. Meta-analysis of Association Studies of CYP1A1 Genetic Polymorphisms with Digestive Tract Cancers Susceptibility in Chinese. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [en línea], 15 (11), 4689-4695. Disponible en: <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4689>
- Liu, H.; Jia, J.; Mao, X. y Lin, Z., 2015. Association of CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms with oral cancer susceptibility. *Medicine (United States)* [en línea], 94 (27), e895. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000895>
- Lopez, M. J. y Alda, D., 2001. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. *Science* [en línea], 911, 203-210. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00068-6)
- Manche, S. K.; Jangala, M.; Putta, P.; Koralla, R. M. y Akka, J., 2016. Association of oxidative stress gene polymorphisms with presbycusis. *Gene* [en línea], 593 (2), 277-283. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.029>
- Martínez Jiménez, C. P., Castell, J. V., Gómez Lechón, M. J. y Jover, R., 2006. Transcriptional activation of CYP2C9, CYP1A1, and CYP1A2 by hepatocyte nuclear factor 4alpha requires coactivators peroxisomal proliferator activated receptor-gamma coactivator 1alpha and steroid receptor coactivator 1. *Molecular Pharmacology* [en línea], 70, 1681-1692. disponible en: <https://doi.org/10.1124/mol.106.025403>.
- Meng, F.; Ma, P.; Sui, C.; Tian, X. y Jiang, Y., 2015. Association between cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Scientific Reports* [en línea], 5 (1), 8108. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep08108>
- Nebert, D. W. y Dalton, T. P., 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* [en línea], 6 (12), 947-960. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrc2015>

- Onofre borja, M. y Reding Bernal, A., 2013. Cáncer pulmonar en mujeres mexicanas, 76 (3), 118-124.
- Paz y Miño, C., 2010. Frecuencia del polimorfismo Ile462Val CYP1A1, 20 (3), 85-91.
- Pennington, M. J.; Rothman, J. A.; Jones, M. B.; McFrederick, Q. S.; Gan, J. y Trumble, J. T., 2018. Effects of contaminants of emerging concern on *Myzus persicae* (Sulzer, Hemiptera: Aphididae) biology and on their host plant, *Capsicum annuum*. *Environmental Monitoring and Assessment* [en línea], 190 (3). Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6503-z>
- Repetto Manuel, 1995. *Toxicología avanzada*. Madrid, Ediciones Díaz de Santos.
- Rozsak, A.; Lianeri, M.; Sowińska, A. y Jagodziński, P. P., 2014. CYP1A1 Ile462Val Polymorphism as a Risk Factor in Cervical Cancer Development in the Polish Population. *Molecular Diagnosis y Therapy* [en línea], 18 (4), 445-450. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40291-014-0095-2>
- Salimi, S.; Sajadian, M.; Khodamian, M.; Yazdi, A. y Rezaee, S., 2015. Combination effect of cytochrome P450 1A1 gene polymorphisms on uterine leiomyoma: A case control study, 1, 209-214.
- Santes Palacios, R.; Ornelas Ayala, D.; Cabañas, N.; Marroquín Pérez, A.; Hernández Magaña, A.; Del Rosario Olgún Reyes, S.; ... Espinosa Aguirre, J. J., 2016. Regulation of Human Cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A Plausible Target for Chemoprevention? *BioMed Research International* [en línea], 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2016/5341081>
- Santiago, C.; Santiago, C.; Bandrés, F.; Bandrés, F.; Gómez Gallego, F. y Gómez Gallego, F., 2002. Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico. *Medicina Del Trabajo*, 11 (3), 130-140.
- Sinal, C. J.; Webb, C. D. y Bend, J. R. (1999). Differential in vivo effects of alpha-naphthoflavone and beta-naphthoflavone on CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver, lung, heart, and kidney. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13 (1), 29-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890445>
- Sophia A., C. y Lima, E. C. (2018). Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150 (June 2017), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.026>
- Teresa, M.; Gualix, Y. J. y Bioquímica, D. De. (2004). Polimorfismo de los citocromos P-450. Importancia fisiopatológica y farmacológica, 91-122.

- Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J. y Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians.*, 65 (2), 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Vázquez Gómez G., Rubio Lightbourn R., Espinosa Aguirre J. J. (2016) Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos arilo en el metabolismo del benzo a pireno y el desarrollo de tumores. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas.* 19 (1), 54-67.
- Verde, Z.; Santiago, C.; Chicharro, L. M.; Reinoso Barbero, L.; Tejerina, A.; Bandres, F. y Gomez Gallego, F., 2016. Effect of genetic polymorphisms and long-term tobacco exposure on the risk of breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], 17 (10). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms17101726>
- Vilana, R.; Forner, A.; Garca, Á.; Ayuso, C. y Bru, C., 2010. Carcinoma hepatocelular: Diagnóstico, estadificación y estrategia terapéutica. *Radiología* [en línea], 52 (5), 385-398. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rx.2010.05.003>
- Wang, F.; Chen, J.; Wang, L.; Ma, Y. y Mayinuer, N., 2015. CYP1A1 genetic polymorphisms and uterine leiomyoma risk: A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8 (3), 3590-3594.
- Wang, J. J.; Zheng, Y.; Sun, L.; Wang, L.; Yu, P. B.; Li, H. L.; ... Ma, T. Y. (2011). CYP1A1 Ile462Val polymorphism and susceptibility to lung cancer: A meta-analysis based on 32 studies. *European Journal of Cancer Prevention* [en línea], 20 (6), 445-452. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328345f937>
- Wang, L. N.; Wang, F.; Liu, J.; Jin, Y. H.; Fang, C. y Ren, X. Q., 2017. CYP1A1 Ile462Val Polymorphism Is Associated with Cervical Cancer Risk in Caucasians Not Asians: A Meta-Analysis. *Frontiers in Physiology* [en línea], 8 (12), 1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01081>
- Williams, I. S.; Joshi, P.; Gatchie, L.; Sharma, M.; Satti, N. K.; Vishwakarma, R. A.; ... Bharate, S. B., 2017. Synthesis and biological evaluation of pyrrole-based chalcones as CYP1 enzyme inhibitors, for possible prevention of cancer and overcoming cisplatin resistance. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [en línea], 27 (16), 3683-3687. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.010>
- Wu, B.; Liu, K.; Huang, H.; Yuan, J.; Yuan, W.; Wang, S.; Chen, T.; Zhao, H. y Yin, C., 2013. Msp1 and Ile462Val Polymorphisms in CYP1A1 and Overall Cancer Risk: A Meta-Analysis PLoS ONE, 8 (12).

Zhu, X.; Wang, Z.; He, J.; Wang, W.; Xue, W.; Wang, Y.; ... Zhu, M.L., 2016. Associations between CYP1A1 rs1048943 A > G and rs4646903 T > C genetic variations and colorectal cancer risk: Proof from 26 case-control studies. *Oncotarget* [en línea], 7 (32), 51365-51374. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10331>

## EN BUSCA DEL PERFIL GENÉTICO DE LA PREECLAMPSIA

*Sindy SanJuan Reyes<sup>1\*</sup>*  
*Leobardo Manuel Gómez Oliván<sup>1</sup>*  
*Jonnathan G. Santillán Benitez<sup>1</sup>*  
*Hariz Islas Flores<sup>1</sup>*  
*Octavio Dublán García<sup>1</sup>*

La preeclampsia es un trastorno multisistémico que se presenta en el embarazo y es una de las principales causas de morbimortalidad perinatal. Estudios publicados en la última década, han contribuido a la comprensión más clara de la fisiopatogenia, por medio de mecanismos clave involucrados: 1) respuesta inmune alterada, 2) disfunción endotelial, 3) estrés oxidativo y respuesta inflamatoria sistémica y 4) susceptibilidad genética. Esta última ha llevado a la propuesta de genes candidatos para el desarrollo de preeclampsia. Objetivo: identificar los principales polimorfismos capaces de predecir el riesgo de preeclampsia. Material y métodos: se realizó una búsqueda, utilizando las bases de datos: *PudMed*, *Elsevier*, *Redalyc* y *Springer Link*, empleando como criterios de inclusión estudios de casos y controles, así como metanálisis de estudios observacionales que examinan las asociaciones entre los factores de riesgo genéticos o asociaciones genéticas y la preeclampsia, estimaciones de *odds ratio* (OR) con significancia estadística ( $p < 0.001$ ), junto con IC del 95% y el intervalo de predicción del 95%. La estrategia de búsqueda utilizó palabras clave “preeclampsia y polimorfismos, metanálisis”. Se excluyeron 5 artículos que no contaban con la metodología descrita o que ésta fuera poco clara. Se realizó la localización cromosómica de cada gen utilizando la base de datos NCBI. Resultados: se obtuvieron un total de 63 artículos, donde se identifica, para cada estudio de polimorfismo candidato un efecto protector o predisponente al desarrollo de preeclampsia y a su severidad, dependiendo de la combinación de alelos y para cada población de estudio; esto último establece la importancia de la heterogeneidad del grupo étnico correspondiente para la expresión genética. Diversos estudios en diferentes poblaciones han identificado

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* sindystjhon@gmail.com

polimorfismos maternos asociados con la preeclampsia a través de enfoques de genes candidatos. La identificación de genes candidatos, ofrece la posibilidad de la obtención de un perfil genético de estudio potencial de investigación para cada población, que conduzca a una mejor orientación para establecer el riesgo para el desarrollo de preeclampsia.

## INTRODUCCIÓN

La preeclampsia es un trastorno hipertensivo asociado al embarazo y representa una de las causas principales causas de morbilidad perinatal a nivel mundial y en México se reporta una incidencia del 10 al 20% de los estados hipertensivos que se presentan en el embarazo en el mundo, específicamente 5 al 10% corresponde a la preeclampsia; así mismo se asocia a una mortalidad del 1.6 por cada 100 000 nacidos vivos. En el 2015, en México, de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la preeclampsia se presenta en 197 por cada 100 000 mujeres embarazadas de 20 a 24 años y 73 por cada 100 000 mujeres de 30 a 34 años. Los trastornos hipertensivos representan la segunda causa de muerte materna con un 21.2% de los casos registrados (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI, 2017).

La etiología y la patogénesis de la preeclampsia siguen siendo poco conocidas. Se han propuesto teorías con un tema común, el de la disfunción de las células endoteliales. Entre los factores en que se apoyan dichas teorías se encuentran: los ambientales, la invasión trofoblástica deficiente, factores vasculares y angiogénicos, el estrés oxidativo y factores genéticos e inmunológicos.

### Definición y clasificación

La preeclampsia es un estado hipertensivo con presencia de proteinuria significativa, que ocurre por primera vez posterior a la 20ª semana del embarazo, durante el parto o el puerperio. Se puede definir también como presencia de hipertensión en el embarazo y un criterio de severidad aún cuando no se haya presentado proteinuria (Rodríguez, 2017).

El American College of Obstetricians and Gynecologists, con las guías de hipertensión en el embarazo (Roberts et al., 2013), clasifica y emite los criterios para el

diagnóstico de preeclampsia y su gravedad: a) moderada: presencia de presión arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg o diastólica  $\geq 90$  mm Hg, b) grave: presencia de una presión arterial sistólica  $\geq 160$  mm Hg o diastólica  $\geq 110$  mm Hg. Además, se considera como un estado grave, si a los datos de hipertensión que pueden estar dentro de los parámetros normales, se agrega uno o más de los siguientes datos: creatinina sérica por encima de 1.2 mg/dL, trombocitopenia  $\leq 150\ 000$  células/mm<sup>3</sup>, incremento de la deshidrogenasa láctica  $\geq 600$  UI, elevación al doble de los valores de aspartato aminotransferasa AST/TGO o alanina aminotransferasa ALT/TGP ( $>70$  UI), cefalea, alteraciones visuales o auditivas, epigastralgia, oliguria  $\leq 500$  mL en 24 horas, edema agudo de pulmón, dolor en hipocondrio derecho, restricción en el crecimiento intrauterino y oligohidramnios. La eclampsia (se caracterizada por preeclampsia más convulsiones o estado de coma sin otra causa) y síndrome HELLP (por sus siglas en inglés: Hemolysis. Elevated Liver enzymes, Low Platelet count syndrome), el cual cursa con hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia.

## Etiopatogenia

De acuerdo con Arenas y Mesa (2008), la explicación del mecanismo etiopatogénico de la preeclampsia se resume en un modelo compuesto de dos etapas para: etapa 1) alteración de perfusión placentaria y etapa, 2) disfunción endotelial o síndrome materno y el papel del estrés oxidativo como el factor común entre el modelo de dos etapas, donde trata de explicar e introducir mecanismos genéticos. Finalmente, propone la existencia de cuatro respuestas fisiopatológicas posibles de la preeclampsia: a) mala adaptación inmunológica, b) isquemia placentaria, c) estrés oxidativo y d) susceptibilidad genética con la existencia de genes codificadores relacionados con la función endotelial y vascular.

En la siguiente revisión nos centraremos en la descripción del papel genético en la etiopatogenia de la preeclampsia; tomando como referencia la utilidad de los marcadores genéticos, la localización y mapeo de genes relacionados con la enfermedad, capaces de predecir el riesgo de preeclampsia.

## Susceptibilidad genética

En la actualidad se ha establecido el desarrollo de preeclampsia en mujeres embarazadas con riesgo a partir de un modelo genético no exclusivamente materno, dado que existe un impacto de genes fetales que contribuyen al riesgo de preeclampsia, lo que explica una contribución adicional de los genes paternos a dicho proceso (Mütze et al., 2008). En tanto que (Esplin et al., 2001) exponen que en los hombres cuyas madres padecieron de preeclampsia durante su gestación, se tiene hasta un 100% de riesgo de que una mujer, por ellos embarazada, desarrolle ésta enfermedad durante la gestación. Por ésta razón, se considera a la preeclampsia como una enfermedad heterogénea y genéticamente compleja sin seguir los mecanismos de herencia mendeliana. La búsqueda de genes de susceptibilidad ha llevado a la propuesta de su intervención en la etiopatogenia de la preeclampsia. Estudios no concluyentes han sugerido la intervención de 26 a 50 genes diferentes responsables de múltiples alteraciones genéticas relacionadas con la preeclampsia (Arenas y Mesa, 2008; Mütze et al., 2008); sin embargo, se han identificado 368 genes diferencialmente expresados en mujeres preeclámpicas y pacientes normotensas (Rajakumar et al., 2011); así mismo, se han descrito al menos 178 genes relacionados con la preeclampsia o el síndrome HELLP (Jebbink et al., 2012), de los cuales pueden ser agrupados de acuerdo al papel que juegan en la etiopatogenia de la enfermedad: placentación, reguladores de la presión arterial, isquemia placentaria, apoptosis, disfunción endotelial, estrés oxidativo, trombosis placentaria, inflamación, así como la función inmune (Arenas y Mesa, 2008).

Algunas investigaciones reportan la asociación entre la preeclampsia y los diferentes genes polimórficos; para su análisis se utilizan dos tipos de metodologías: 1) estudios de ligamiento genético, que identifica regiones cromosómicas en las familias en las que se presenta la entidad de estudio y 2) estudios de asociación, al identificar genes candidatos implicados en etiología de la enfermedad con particularidad especial de población (Arenas y Mesa, 2008; Carrillo et al., 2013).

## Polimorfismos asociados a la preeclampsia

### *Genes implicados en la función inmune y respuesta inflamatoria*

El embarazo exitoso requiere de la adaptación materna, mediante una coordinación exitosa del sistema inmune innato y adaptativo que evite el rechazo del trofoblasto, que permita una placentación adecuada, el crecimiento y desarrollo armónico del feto. Se ha reportado la participación de las células asesinas naturales NK (por sus siglas en inglés, Natural Killer), el sistema del antígeno leucocitario humano (clase I-receptor C) HLA-C (por sus siglas en inglés, Human Leukocyte Antigen) en el trofoblasto fetal y las células T en la regulación del embarazo, e identificado polimorfismos de nucleótido único en estos sistemas de genes en el desarrollo de la preeclampsia. La invasión trofobástica superficial y la placentación anormal secundaria, característicos de la preeclampsia, generan un ambiente de hipoxia y el estallido de una respuesta inflamatoria local y sistémica.

### Sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) e inmunoglobulinas de células asesinas (Nk)

El complejo mayor de histocompatibilidad, se expresa en el trofoblasto extraveloso invasivo en las etapas tempranas de embarazo como una variante polimórfica del antígeno leucocitario humano-C (HLA-C específica, clase I-receptor C). El HLA-C es el ligando dominante para los receptores tipo inmunoglobulina asesina KIR (por sus siglas en inglés, Killer Immunoglobulin-like receptor) que se expresan en las células asesinas naturales uterinas UNK (por sus siglas en inglés Uterine Natural Killer). El sistema KIR contiene dos haplotipos diferentes A y B y se presume que algunas combinaciones KIR/HLA-C son más favorables para la invasión de células trofoblásticas. Esta interfaz inmunológica retrocede en la segunda mitad del embarazo cuando el sincitio veloso que está desprovisto de expresión de HLA se vuelve dominante (Jebbink et al., 2012). El cromosoma 6 alberga el gen del HLA, específicamente al miembro de la molécula de HLA clase I, en sus genes 6p21.32-p22.1, cuyos polimorfismos de nucleótido único SNP (por sus siglas en inglés, single nucleotide polymorphism) han sido identificados en placentas de mujeres embarazadas y el desarrollo de preeclampsia en la población caucásica (Hiby et al., 2004; Moreau et al., 2008; Small et al., 2017). Los polimorfismos

de KIR materno y el HLA-C fetal se han analizados, y se informa que la combinación del gen KIR AA materno y los alelos de HLA-C fetal se asocian con preeclampsia (OR = 1.49,  $p = 0.0318$ ). Los genes KIR (genes KIR2DS5 y KIR2DL1) asociados con la protección al desarrollo de preeclampsia, se encuentran en las regiones centroméricas KIR B, que son exclusivas de las poblaciones del África subsahariana (OR = 0.59,  $p = 0.0095$ ); por el contrario, los genes teloméricos KIR B protegen a la población europea contra la preeclampsia (Nakimuli et al., 2015).

### Aminopeptidasas 1 y 2 (ERAP 1 y 2)

Las aminopeptidasas ERAP (por sus siglas en inglés, Endoplasmic Reticulum Amino-peptidase) 1 y 2 del retículo endoplásmico, tienen como función la presentación del antígeno dentro de la respuesta inmune (maduran el epítipo presentado por MHC clase I), ambos genes están regulados por el interferón gamma y están implicados en la inflamación. También pueden regular la angiogénesis y la presión arterial, a través del recorte de angiotensina II y angiotensina III, respectivamente (Tanioka et al., 2003); los polimorfismos de nucleótido único (SNP) de las aminopeptidasas ERAP 1 y 2 (p.392 K>N y p.669 L>Q; rs2549782 y rs17408150) respectivamente, han sido asociadas con susceptibilidad al desarrollo de preeclampsia en mujeres caucásicas y asiáticas (Hill et al., 2011; Johnson et al., 2010). Un metanálisis hace referencia que para el polimorfismo HLA-G 14 pb I/D (rs66554220), observó una asociación significativa para el riesgo de preeclampsia en nulíparas (OR = 1.66-1.95,  $p = 0.04$ ), así como en embarazos caucásicos europeos (OR = 1.37-2.03,  $p = 0.02-0.03$ ) (Pabalan et al., 2015).

### Citocinas proinflamatorias

Una característica fisiopatológica central de la preeclampsia como síndrome es la inflamación sistémica, implicada en una disfunción endotelial extensa en el sistema vascular materno; la respuesta humoral se identifica con la actividad de citocinas proinflamatorias, específicamente las citocinas Th 1 y 2: Interleucina IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, que resulta en la producción de diversos mediadores inflamatorios. Los SNP IL-1 R1 (rs3771202), IL-6 R (rs7549250, rs2229238), TNFSF11 (rs9525643,

rs2200287, rs2148072) e IL-5 RA (rs163551, rs163550) se han asociado con riesgo de preeclampsia de acuerdo a su severidad (leve y severa) y según al tiempo de aparición (temprana y tardía) en mujeres asiáticas (Wu et al., 2017). Así mismo se concluye que la variante genética IL-10 -592A/C se asocia con el riesgo de preeclampsia en mujeres embarazadas (Fan et al., 2017). Las mujeres con genotipo AA IL-10 (-1082) tienen un riesgo 3.38 veces mayor de desarrollar preeclampsia en comparación al genotipo GG (IC 95%: 1.21-9.4,  $p = 0.01$ ), siendo los polimorfismos del factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) (-308 G/A) y la interleucina IL-6 (-174 G / C), no significativos para dicho riesgo (Vural et al., 2010). En un estudio en México, en mujeres mexicanas-mestizas y mayas-mestizas, no se encontró asociación entre los polimorfismos de IL-10, IL-6 e IL-1 RA y la susceptibilidad a preeclampsia (Valencia et al., 2012).

El sistema del complemento, es una parte del sistema inmune involucrado en la regulación de la inflamación, eliminación de microorganismos y de tejidos extraños, se puede activar mediante la vía clásica o vía alterna. La vía alterna del complemento se activa en embarazos que desarrollan preeclampsia severa (Hoffman et al., 2014). La IL-8 es considerada como una quimiocina proinflamatoria; se reconocen 3 polimorfismos (-353A/-251A/+678T AAT). La presencia de haplotipo AAT en mujeres embarazadas parece ser un factor de riesgo para preeclampsia. En estudio de casos y controles se establece que éstos 3 polimorfismos se relacionan con el desarrollo de preeclampsia (OR = 1.491, IC 95% = 1.005-2.213,  $p = 0.047$ ) (Sun et al., 2016). La IL-27 citocina proantiinflamatoria se ha identificado en niveles elevados en las células trofoblásticas de placentas de mujeres preeclámpticas; en una población asiática en un estudio de casos y controles, el genotipo CC de rs153109 fue significativamente mayor en los casos de preeclampsia (OR = 1.54, IC 95%: 1.23-1.93,  $p < 0.001$ ), el genotipo CC de rs153109 fue más prevalente ( $p < 0.001$ ) (Liu et al., 2016). Sin embargo, en una población asiática similar, se reporta un riesgo significativamente reducido de preeclampsia en el genotipo rs153109 GG en comparación con los genotipos AA o AA/AG (GG contra AA: OR = 0.51, IC 95% = 0.30-0.86; GG contra AA/AG: OR = 0.60, IC 95% = 0.37-0.98). Los genotipos AG/GG fue particularmente significativa en el subgrupo de preeclampsia grave (OR = 0.65, IC 95% = 0.45-0.92) y el subgrupo de preeclampsia grave de inicio temprano (OR = 0.51, IC 95% = 0.30-0.87) (Chen et al., 2016). El FNT- $\alpha$  interviene en la patogénesis de la preeclampsia como un factor del estado inflamatorio y metabólico. Los polimorfismo (G-308A) y el genotipo AA del TNF- $\alpha$  (G-238A) fueron significativamente mayores en los

casos con preeclampsia con respecto a los controles ( $p < 0.001$ ) en una población Iraní (Tavakkol et al., 2016).

### Sistema del complemento

El complemento regula la interfaz de la placenta y el feto al inicio del embarazo y durante la gestación. Las variaciones en los genes del complemento se han relacionado en la etiología de la preeclampsia. El complemento C3 es el componente central de todas las vías de activación y su papel en la discriminación del yo y el no yo. Se han descrito 3 polimorfismos de C3 que se asocian con el desarrollo de la preeclampsia grave: rs2287845, rs366510 y rs2287848; y 16 haplotipos de SNP con desequilibrio de ligamiento extremo en el medio del gen con efecto protector ( $OR = 0.628$ ,  $p = 0.044$ ) o predisponente ( $OR = 2.110$ ,  $p = 0.011$ ) a preeclampsia severa dependiendo de la combinación de alelos (Lokki et al., 2017). Los SNP del C6 se han considerado como factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia; así mismo, el gen de serina proteasa 1 MASP1 (por sus siglas en inglés, mannose-associated serine protease) desempeña un papel central en la iniciación de la ruta de lectina; en el embarazo, altera la invasión de arterias espirales (Dobó et al., 2014). Se reporta que los polimorfismos C6 (rs7444800, rs4957381) y MASP1 (rs1108450, rs3774282, rs698106) se asocian con el riesgo de preeclampsia de aparición temprana y preeclampsia severa, mientras que los polimorfismos MASP1 (rs1357134, rs698090) se asocian con el riesgo de preeclampsia de aparición tardía y preeclampsia severa en la población asiática (Wu et al., 2016) (tabla 1).

Tabla 1. Genes implicados en la función inmunológica

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>SNP</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Población</i>	<i>Autor</i>
	Las aminopeptidasas 1 y 2.	p.392 K>N y p.669L>Q		Australia/ Nueva Zelanda/ Noruega	Johnson M. P. et al., 2009
ERAP 1-2	Respuesta inmune por medio de la presentación del antígeno.	rs2549782 rs17408150	5q15	Afroamericana	Hill L. D. et al., 2011
TNFSF11A	Miembro de la súper-familia de receptor del FNT.	rs9525643 rs2200287 rs2148072	18q21.33	China	Wu W. et al., 2016
TNFSF13B	Activador del receptor del factor nuclear kB (RANK), mediante la activación de las células T y, por consiguiente, la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y IL-12).	rs16972194 rs16972197 rs56124946	17p11.2	Australia/Nueva Zeland	Fenstad M. H. et al., 2010.
HLA-A + HLA-DRB1	Miembro de la molécula HLA clase I MHC. Codifica una subunidad de un receptor MHC clase II, están restringidos a células presentadoras de antígeno.	SNP 1370	6p21.3	Kazan, Rusia	Small H. et al., 2017
HLA-G	Miembro de la molécula HLA clase I y tiene propiedades inmunosupresoras.	G*0106 HLA-G rs66554220	6p22.1	Francia	Moreau P. et al, 2008 Metaanálisis
HLA-C	Antígenos de histocompatibilidad polimórficos  (Trofoblasto fetal).	HLA-C2 fetal + KIR AA materno	6p21.33	Inglaterra	Hiby S, et al., 2004
	Receptores de inmunoglobulina asesina (KIR).	HLA-C fetal + KIR AA/B 2DS5 y KIR2DL1	19q13.42	Población africana y caucásica	Nakamuli, et al., 2015

*Continúa...*

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>SNP</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Población</i>	<i>Autor</i>
		IL-1R1 (rs3771202)	2q11.2-q12.1		
IL-1, IL-5, IL-6	Citocinas proinflamatorias. Citoquinas Th2 IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que se asocian con ayuda para la inmunidad humoral.	IL-5RA (rs163551, rs163550)	3p26.2	China	Wu W. et al., 2016
		IL-6R (rs2229238, rs7549250)	1q21.33		
		TNFSF11A	18q21.3		
		IL-10 -1082 A rs1800896		Turquía	Vural P. et al., 2010
IL-10	Citocina antiinflamatoria considerada como un regulador de la producción de citoquinas por las células Th1 y los macrófagos.	FNT alfa rs1800629			
		IL-6 rs 1800795	1q32.1	China	
		IL-10 -592A/C			
		IL-6 572G/C -597G/A -174G/C			Fan D. M. et al., 2017
IL-8	Miembro de la familia de las quimiocinas CXC proinflamatoria. Principal quimio-atrayente para los neutrófilos.	+781C/T 352A/T 4073A/T	4q13-q21	China	Sun L. et al., 2016
		Citocina heterodimérica de la familia IL-12 / IL-6. rs17855750 rs153109		China	Chen P. et al., 2016
IL-27	Activa una variedad de objetivos celulares, lo que mejora las reacciones inflamatorias.	rs153109/ CC	16p12.1-p11.2	China	Lui B. et al., 2016
		Factor de necrosis tumoral alfa. G-308A			
FNT alfa	Citoquina proinflamatoria. Activación endotelial.	G-238A	6p21.3	Irán	Tavakkol A. Z. et al., 2016

*Continúa...*

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>SNP</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Población</i>	<i>Autor</i>
C6	Interactúa con proteínas del complemento para formar el complejo de ataque de membrana (MAC), que crea poros en las membranas e induce la lisis celular.	s7444800 rs4957381	5p13.1	China	Wu W. et al., 2016
C3	El sistema del complemento, involucrado en la generación de inflamación, apoptosis y eliminación de microorganismos.	rs2287845 rs366510 rs2287848	19p13.3	Finlandia	Lokki A. I. et al., 2017

Elaboración propia.

### *Principales genes que regulan la función endotelial y proteínas vasoactivas*

El proceso de invasión del citotrofoblasto extravascular en las arterias espirales, se acompaña de una transición epitelial a endotelial que involucra factores angiogénicos y factores que regulan la función capilar. Se han identificado polimorfismos de los diferentes genes implicados en la remodelación y función endotelial, genes del sistema renina-angiotensina aldosterona (sistema que regula la presión sanguínea) y en los genes que codifican información sobre proteínas vasoactivas y cambios hemodinámicos, que participan en la patogenia de la preeclampsia.

#### Enzima convertidora de angiotensina (ECA) y angiotensinógeno (AGT)

El polimorfismo en el intrón 16 inserción/delección (I/D) de la enzima convertidora de angiotensina ECA, se asocia a cambios en su actividad. En un metanálisis de polimorfismos de genes vaso-activos relacionados con preeclampsia, se reporta que el SNP de I/D de la eca, demostró significancia estadística cuando se consideró el polimorfismo bajo el modelo recesivo (OR 1.51, IC del 95%: 1.17-1.94) con la presencia de preeclampsia, sin embargo otros estudios realizados en una población china e hispana, no encontraron una asociación significativa de la delección con la preeclampsia. En el mismo estudio se identificó una asociación estadísticamente

significativa para el polimorfismo del gen del angiotensinógeno AGT M235T (potente vasoconstrictor, precursor de la angiotensina II, principal sustrato del sistema renina-angiotensina-aldosterona que regula la homeostasis de sodio-agua, que en condiciones normales regula el flujo sanguíneo feto-placentario) y el desarrollo de preeclampsia si el polimorfismo se considera bajo el modelo genético dominante (OR 1.65, IC 95%: 1.19-2.29), y (OR 1.54, IC 95% 1.12-2.11) bajo el modelo recesivo (Medica et al., 2007). Algunos años más tarde, un metanálisis informó un riesgo mayor de preeclampsia para el polimorfismo de ACE rs4646994 (OR = 1.17; IC 99%: 0.99-1.40), y para el SNP AGT rs699 (OR = 1.26; IC 99%: 1.00-1.59) (Staines et al., 2012). En tanto para el SNP AGT M235T, el genotipo TT se asoció al desarrollo de preeclampsia (OR 1.61, IC 95% 1.22-2.14,  $p = 0.001$ ) en una población caucásica y mongola, pero no para la población africana (Lin et al., 2012). Un estudio en Polonia evaluó el riesgo de preeclampsia e hipertensión gestacional; el genotipo CC del polimorfismo AGT M235T aumentó el riesgo de hipertensión gestacional (Kusmierska et al., 2015).

### Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

El óxido nítrico (NO) es un importante regulador de la vasodilatación y remodelación vascular, sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial eNOS (por sus siglas en inglés, endothelial nitric oxide synthase); es trascendente para el mantenimiento de la vasodilatación sistémica materna y la reducción de la reactividad vascular durante el embarazo normal. En numerosos estudios se ha comprobado una disminución del NO endotelial en los trastornos hipertensivos del embarazo complicados con preeclampsia. El gen eNOS 3 está ubicado en el cromosoma 7q35-q36. Se identifica una asociación significativa del polimorfismo del gen G298A eNOS y la presencia de preeclampsia, en un análisis de biomarcadores del estrés oxidativo: malondialdehído (MDA) y los niveles del óxido nítrico (NO), la variación intergenotípica de los niveles de NO y MDA resultó ser significativa ( $p = <0.001$ ) (Sharma et al., 2011). En tres metanálisis en los últimos seis años, se analizaron 3 polimorfismos de eNOS y el riesgo de preeclampsia, así como la concentración sérica de NO; se concluyó que el polimorfismo T-786C está relacionado con el aumento del riesgo de preeclampsia en el modelo dominante (OR = 1.17, IC del 95% = 1.02-1.35),

un alelo para 4 b/a muestra alto riesgo de preeclampsia (OR = 1.46, IC 95% = 1.01-2.10) (Dai et al., 2013). El polimorfismo homocigoto TT de G894T se asoció con el riesgo de preeclampsia (OR = 1.17, IC 95%: 1.01-1.36) en una población caucásica, asiática e hispana; y un (OR = 1.46, IC 95% = 1,21-1,77,  $p < 0.001$ ) en poblaciones no asiáticas. El genotipo CC de T-786C también se asoció con un mayor riesgo de preeclampsia (OR = 1.30, IC 95% = 1.07-1.58,  $P = 0.034$ ) en caucásicos y africanos. Para el análisis alélico de la variante 4 b/a, del alelo b mostró una significación negativa (OR = 0,55; IC del 95%: 0,36-0,84) (Chen et al., 2012; Zeng et al., 2016).

### Proteínas que regulan la angiogénesis

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es esencial para un embarazo exitoso. El factor de crecimiento vascular endotelial VEGF (por sus siglas en inglés, Vascular Endothelial Growth Factor), el factor de crecimiento placentario PlGF (por sus siglas en inglés, placenta growth factor) y su receptor de tirosina quinasa 1 similar a FMS sFlt-1 (por sus siglas en inglés, soluble fms-like tyrosine kinase 1) estimulan la vasculogénesis placentaria y la angiogénesis; la interacción que conduce a niveles circulantes disminuidos de PlGF y de VEGF y a un aumento de sFlt-1 se han reportado en las mujeres preeclámpicas con el desarrollo de proteinuria e hipertensión.

#### *Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)*

El gen del VEGF que modula el ciclo celular, la migración y la diferenciación endotelial se localiza en el cromosoma 6p12. Se han mencionado polimorfismos de nucleótido único del gen VEGF y el riesgo de preeclampsia en población afroamericana y caucásica: Los SNPs de VEGF C rs1485766, rs6838834 y rs7664413, se asocian al desarrollo de preeclampsia (OR = 1.56, IC 95%, 1.05-2.30;  $p = 0.03$ ), (OR, 1.60, IC 95%, 1.05-2.45;  $p = 0.03$ ) y (OR = 2.04, IC del 95%, 0.99-4.17;  $p = 0.04$ ) respectivamente; así mismo, el SNP del gen Flt-1 rs12584067 (OR = 1.55, IC 95%, 1.01-2.36;  $p = 0.05$ ) y rs7335588 y (OR = 1.61, IC 95%, 1.06-2.43;  $p = 0.01$ ) se asocian al riesgo de preeclampsia en mujeres africanas; los SNPs rs722503 (OR = 2.12, IC 95%, 1.07-4.19;

$p = 0.03$ ) y Flt-4 rs307826 (OR = 3.06, IC 95%, 1.18-7.91;  $p = 0.01$ ) en mujeres caucásicas desarrollan preeclampsia (Srinivas et al., 2010). Mientras, en un estudio en población mexicana, mostró que los polimorfismos rs699947 (-2578C/A), rs1570360 (-1154G/A), rs2010963 (+ 405G/C) y rs25648 (-7C/T), no se asocia a preeclampsia (Garza et al., 2011). En un metanálisis con un total de 1069 casos de preeclampsia y 1315 controles, menciona que el VEGF +936C/T (T frente a C, OR = 1.52, IC 95% = 1.08-2.12) y el polimorfismo -634G/C (C frente a G) (OR = 1.24, IC 95% = 1.03 -1.50) se asociaron con el riesgo de preeclampsia, mientras que el polimorfismo VEGF -2578C/A y -1154G/A no tuvieron asociación (Cheng et al., 2013). En un estudio reciente de población caucásica se correlacionó el polimorfismo de VEGF y la severidad de la preeclampsia, el genotipo DD VEGF -2549 fue significativo en las mujeres con preeclampsia grave (OR = 2, IC 95%, 1-3.7;  $p = 0.04$ ), la frecuencia de los genotipos VEGF -634 GC y CC fue mayor en las mujeres con preeclampsia severa (OR = 5.9, IC 95%, 1.9 - 18.2;  $p = 0.002$ ) y (OR = 3.2, IC 95%, 1.7-6.1,  $p = 0.001$ ) respectivamente. La frecuencia del haplotipo DGC de los polimorfismos VEGF -2549 (rs35569394), -1154G/A (rs1570360) y -634G/C (rs2010963) se asoció con un riesgo 2.9 veces mayor de preeclampsia (OR = 2.9, IC 95%, 1.6-5.3;  $p = 0.0005$ ). La frecuencia del haplotipo IAG fue significativamente menor, con potencial de ser un factor protector contra la susceptibilidad a la preeclampsia (Keshavarzi et al., 2017). Estas diferencias resaltan la variabilidad e implicaciones de la presencia o ausencia de SNP en diversos grupos étnicos.

#### Factor de crecimiento transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

El factor de crecimiento transformador- $\beta$ 1 TGF- $\beta$ 1 (por sus siglas en inglés, transforming growth factor beta 1) regula el crecimiento y la diferenciación del trofoblasto (incluida la regulación de la invasión de citotrofoblastos extravasculares), la adaptación inmune materna al embarazo y la remodelación vascular. La región de codificación del gen TGF- $\beta$ 1 consiste en 7 exones y 6 intrones, su ubicación cromosómica es 19q13.2. Se ha informado que el polimorfismo 788C/T (Thr 263 Ile) del gen TGF- $\beta$ 1 es un factor importante que media el riesgo de preeclampsia (Khani et al., 2015). El genotipo TT del polimorfismo 869T/C es un factor protector de la preeclampsia grave en una población del norte de México (Aguilar Duran et al., 2014). En un

estudio en la India, los polimorfismos  $TGF-\beta 1$  C-509T y T869C revelaron una influencia significativa en el riesgo de preeclampsia ( $p = 0.01$  y  $p = 0.002$ , para los polimorfismos respectivamente); bajo el modelo dominante, el genotipo CT del polimorfismo  $TGF-\beta 1$  C509T mostró un alto efecto protector, mientras que para los haplotipos TT y CC de la misma variante, parece ser un genotipo predisponente de preeclampsia (OR = 4.72;  $p = 0.031$ ) y (OR = 5.39;  $p = 0.03$ ) respectivamente; además, se observó un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos (Deepthi et al., 2015).

#### *Factor 1 derivado de las células del estroma (SDF-1)*

El factor 1 derivado de las células del estroma SDF-1 (por sus siglas en inglés, stromal cell-derived factor 1) ha sido involucrado en el riesgo de preeclampsia en la vasculogénesis *de novo* y la angiogénesis, un proceso clave en la placentación. Localmente aumenta la vasculogénesis y posteriormente contribuye a la isquemia-neovascularización. Se informa la asociación del polimorfismo SDF-1 3'A o G801A (rs1801157) y la presencia de preeclampsia; la frecuencia del genotipo GA fue mayor (OR = 2.0, IC del 95% = 1.03-3.87;  $p = 0.04$ ), así mismo, para el polimorfismo rs2228014 CXCR4 genotipo CT (OR = 2.34, IC 95% = 1.19-4.62;  $p = 0.013$ ) y el desarrollo de preeclampsia (Karakus et al., 2017) (tabla 2).

Tabla 2. Genes que regulan la función endotelial y proteínas vasoactivas

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>SNP</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Población</i>	<i>Autor</i>
ECA	Enzima convertidora de angiotensina.	I/D intrón 16	17q23.3		Metanálisis. I. Medica, 2007
		Alu de 287			Kusmierska-K. Urban et al., 2015
AGT	Angiotensinógeno	Glu298Asp Met235Thr I/D intrón 16	1q41	Caucásicos y mongoles, no en africanos	Metanálisis. I. Medica, 2007
	Precursor de la angiotensina II y principal sustrato del sistema renina-angiotensina-aldosterona.	rs699 (M235T), también descrita como M268T o T704C): TT		Polonia: caucásica	Lin et al., 2012
	Vasoconstrictor.	M235T: CC		India	Kusmierska-K. Urban, et al., 2015 D. Sharma et al., 2011
<i>eNOS/NOS3</i>	Óxido nítrico sintasa endotelial. Implicada en la remodelación vascular y la vasodilatación.	Glu298Asp-786T>C	7q35-q36	Caucásica, asiática, hispana	Metanálisis Dai et al., 2013
		- 786 T> C, 4b/a		Caucásica, asiática, hispana	Metanálisis Chen et al., 2012
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular. Modula el ciclo celular, la migración y la diferenciación endotelial.	El alelo del intrón 4a, G894T	6p12	Caucásicos y africanos	Metanálisis Zeng et al., 2016
		- 786 T> C: CC G894T: TT		Afroameri- canas Caucásicas	S. K. Srinivas et al., 2010
		rs1485766 rs6838834 rs7664413 rs2010963(-634G/C) rs3025039(+936 C/T) rs2010963(-634G/C) rs35569394 (-2549) rs1570360 (1154G/A)		Caucásica, asiática, hispana Irán	Metanálisis. D. Cheng et al., 2013
<i>Flt-1</i>	Tirosina quinasa relacionada con FMS. Muestra la actividad de la proteína tirosina quinasa.	rs12584067 rs7335588 rs722503 <i>Flt-4</i> rs307826	13q12.3	Africanas Caucásicas	F. Keshavarzi et al., 2017 S. K. Srinivas et al., 2010

Continúa...

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>SNP</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Población</i>	<i>Autor</i>
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1.	C509T y T869C	19q13.2	India	G. Deepthi et al., 2015
		788C/T (Thr 263 Ile)		Irán	M. Khani et al., 2015
	Inhibidores potentes de la diferenciación y migración del trofoblasto.	T869C:TT		México	M. Aguilar et al., 2014
SDF-1	Factor 1 derivado de las células del estroma.	rs1801157 G801A	10q11.21	Turquía	S. Karakus et al., 2016
CXCL12	Participa en la vasculogénesis y angiogénesis.	rs2228014 CXCR4			

Elaboración propia.

### *Genes implicados en el estrés oxidativo*

En la actualidad se ha establecido el papel del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la preeclampsia, éste se define como el resultado del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante. A nivel placentario, las vellosidades placentarias se encuentran expuestas a concentraciones fluctuantes de oxígeno. Se produce una invasión defectuosa del trofoblasto, produciendo una intermitencia del flujo sanguíneo arterial, el estrés oxidativo surge de tales lesiones hipóxicas y de reoxigenación, estimulando la apoptosis del sincitiotrofoblasto que da como resultado una alteración de la función placentaria característica de la preeclampsia. La reducción de la perfusión debido a la placentación aberrante y la invasión superficial de trofoblasto, desencadena una condición de estrés oxidativo placentario y conduce a una respuesta inflamatoria intravascular y disfunción endotelial sistémica materna (Matsubara et al., 2015; Sánchez et al., 2014).

## Glutación S-transferasa (GST)

Dentro de los sistemas antioxidantes, la glutatión S-transferasa (GST) ha sido ampliamente estudiada en asociación con el riesgo a preeclampsia. Las glutatión S-transferasa son una familia de enzimas de desintoxicación esenciales para la protección celular contra el estrés oxidativo, así como la biotransformación de xenobióticos y carcinógenos; además, poseen una amplia gama de sustratos tales como radicales alifáticos y heterocíclicos. La familia de GST ha sido asignada en ocho clases distintas: alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta (Seidegard, 1997). La clase mu codificada por el gen GSTM1 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 (1p13.3), la clase theta codificada por el gen GSTT1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.23), la clase pi GSTP1 se ubica en el brazo largo del 11 (11q13.2). La clase alfa y zeta (GSTA1 y GSTZ1) se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 (6p12.2) y brazo largo del cromosoma 14 (14q24.3) respectivamente. Se han descrito polimorfismos de los genes de la GST y su relación con la preeclampsia, lo que lleva a pensar en una menor capacidad de desintoxicación placentaria.

Para ambos genes GSTM1 y GSTT1 muestran una delección homocigótica heredada (genotipo nulo) que da como resultado la ausencia virtual de actividad enzimática en individuos con dichos genotipos (Hayes y Strange, 2000). En un metanálisis de 5 estudios identificados, donde se incluyeron 1217 mujeres embarazadas (515 con preeclampsia y 702 controles) en relación con los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, no se asociaron con susceptibilidad a preeclampsia (Anvar et al., 2011). En México, se informó que el polimorfismo nulo GSTT1 mostró un riesgo significativo de preeclampsia (OR = 2.21, IC 95% = 1.14-4.27, p = 0.018); además, este riesgo se incrementó con la combinación de ambos polimorfismos nulos de GSTM1 y GSTT1 (OR = 4.56, IC 95% = 1.59-13.09, p = 0.005) (Sandoval et al., 2014). En contraste con la población asiática, se reportó que la presencia de genotipos nulos de GSTT1 y GSTM1, mostraron un riesgo disminuido de preeclampsia (OR = 0.470, IC 95% = 0.255-0.866, p = 0.015) (Guan et al., 2016). El contraste de dichos resultados puede explicarse por la gran heterogeneidad genética en la población mexicana mestiza en comparación con las poblaciones caucásicas o asiáticas. Recientemente se ha propuesto la asociación entre el polimorfismo GSTA1 -69C/T (rs3957357) y el riesgo de hipertensión gestacional (Lorio et al., 2015). En un estudio Iraní, se

identificó que el polimorfismo G42A de GSTZ1 disminuyó el riesgo de preeclampsia (OR = 0.24, IC 95% 0.08-0.73;  $p = 0.012$ ) (Saadat et al., 2012).

### Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima implicada en la conversión de radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Hay tres isoformas, una dependiente de manganeso localizado en las mitocondrias y codificada por Mn-SOD o el gen SOD2 (cromosoma 6q25.3). Las otras dos formas que contienen cobre/zinc se localizan en el citoplasma o extracelularmente y están codificadas por CuZnSOD o SOD1 (cromosoma 21q22.1) y el gen EC-SOD o SOD3, respectivamente (cromosoma 4p16.3-q21) (Faraci y Didion, 2004).

En el estudio realizado en una población mexicana maya-mestiza, describe que los polimorfismos MTHFR 677T y GSTP1 313G confieren un riesgo significativamente menor de desarrollar preeclampsia (Canto et al., 2008); mientras que en Egipto, concluyen que las mujeres portadoras del alelo Val (G) de GSTP1 A313G son más susceptibles a la preeclampsia, ya sea en el estado homocigoto o heterocigoto (OR = 4.712, IC 95% = 2.178-10.193;  $p = 0.0001$ ), en cambio el polimorfismo del gen Mn-SOD (rs4880) no tuvo significancia (Alaa et al., 2015). En una población de mujeres húngaras, se propone el papel del polimorfismo de nucleótido único SOD3 A40T en el riesgo de preeclampsia complicada de restricción del crecimiento fetal (Rosta et al., 2009); en tanto que, en mujeres rumanas, se encontró que los polimorfismos Ala-9Val (Mn-SOD) y Arg213Gly (EC-SOD), se asociaron significativamente con la preeclampsia (OR = 5.99,  $p = 0.004$ ) y (OR = 4.23,  $p = 0.027$ ) respectivamente en asociación con los genotipos Val/Val y Gly/Gly (Procopciuc et al., 2012).

### Glutation peroxidasas (Gpx)

Las glutacion peroxidasas (Gpx) son enzimas que reducen el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de lípidos en agua libre o los correspondientes alcoholes no reactivos, usando GSH como cosustrato obligado para proteger al organismo del daño oxidativo (Sánchez et al., 2014). Las Gpx están codificadas por la familia de

genes GPx relacionados filogenéticamente, ubicados en diferentes cromosomas; las más estudiadas por su relación a la susceptibilidad de preeclampsia son la GPx-1, localizada en el cromosoma 3p21 y la GPx-4 (participa en otras funciones, como la fertilidad masculina y la apoptosis), cuyo gen se ubica en el cromosoma 19p13.3. El polimorfismo de rs713041 de la GPx-4 está asociado el desarrollo de preeclampsia leve, grave y de aparición temprana en una población asiática; el alelo C tiene el mayor riesgo de preeclampsia ( $\chi^2 = 12.292$ ,  $p = 0.002$  por genotipo; OR = 1.216, IC 95% 1.084-1.365) (Peng et al., 2016).

Figura 1. Genes del estrés oxidativo involucrados en el riesgo de preeclampsia



GST (Glutation S Transferasa), SOD (Superóxido Dismutasa), GPX (Glutation Peroxidasa), EPHX (Epóxido hidrolasa microsomal)  
Elaboración propia.

### *Principales genes implicados en las trombofilias y el metabolismo en el embarazo relacionados con el riesgo de preeclampsia*

Las trombofilias asociadas al embarazo aumentan el riesgo de tromboembolismos en las vellosidades placentarias y a la apoptosis del citotrofoblasto endovascular (arterias

espirales), aunado a una actividad procoagulante que contribuye al desarrollo de preeclampsia y a complicaciones del embarazo como pérdida gestacional recurrente, parto prematuro y restricción en el crecimiento intrauterino.

Factores de coagulación específicos: factor v de Leiden, protrombina y factor activador del plasminógeno

Se han reportado polimorfismos de nucléido único en genes que codifican factores de coagulación específicos. Los SNP del factor v de Leiden de la coagulación (factor FVL) G1691A y la protrombina (PT) G20210A PT 20210, se han evaluado con resultados inconsistentes, ambos genes localizados en el cromosoma 1q23 y 11p11 respectivamente. Un metanálisis de población asiática, reúne estudios reportados de estos polimorfismos y su asociación con el desarrollo de preeclampsia, se encontró una asociación del polimorfismo de la protrombina G20210A y el riesgo de preeclampsia (OR = 1.81; IC del 95%: 1.25-2.63) y para preeclampsia grave (OR = 3.02; IC del 95%: 2.06 - 4.45). Mientras tanto, para el SNP del factor v Leiden y la preeclampsia (OR = 1.60; IC del 95%: 1.28-2.00) y (OR = 2.45; IC del 95%: 1.63-3.69) para los casos de preeclampsia grave (Wang et al., 2014); mientras un estudio en México, reporta resultados de no asociación para el desarrollo de preeclampsia para el SNP FVL (Dávalos et al., 2005). El genotipo GA del polimorfismo FV G1691A fue mayor en la preeclampsia de aparición temprana en comparación con la preeclampsia de inicio tardío (OR 2.8; IC del 95%: 1.1-7.2;  $p = 0.034$ ) de acuerdo a lo informado por (Salimi et al., 2015). El polimorfismo del activador del inhibidor del plasminógeno-1 PAI-1 (por sus siglas en inglés, Plasminogen Activator Inhibitor-1), que como mecanismo propuesto es un regulador clave de la actividad fibrinolítica endógena, del endotelio activado, promueve la trombosis arterial o intercelular espiral que reduce la perfusión placentaria. El PAI-1 (-675 4G/5G), en un metaanálisis reportó una asociación del gen recesivo (OR = 1.28; IC 95%: 1.09-1.50); y del gen dominante (OR = 1.21, IC 95%: 1.01-1.44) para preeclampsia (Morgan et al., 2013), en tanto el metanálisis que describe el papel de varios polimorfismos para preeclampsia reporta que sólo el polimorfismo PAI-1 4G/5G (modelo recesivo) fue respaldado por una fuerte evidencia de una contribución a la patogénesis de la preeclampsia (Giannakou et al., 2018).

## Enzimas que participan en el metabolismo de la homocisteína

La metilentetrahidrofolato reductasa *MTHFR* (por sus siglas en inglés, methylenetetrahydrofolate reductase), la metionina sintasa *MTR* (por sus siglas en inglés, 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase) y la metionina sintasa reductasa *MTRR* (por sus siglas en inglés, 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase) son enzimas importantes en el metabolismo de la homocisteína (metilación de la homocisteína a metionina); los genes de dichas enzimas se ubican en los cromosomas 1p36.22, 5p15.31 y 1q43 respectivamente (Barbosa et al., 2008).

El folato y la metionina son esenciales para el desarrollo placentario y fetal. Una alteración en la expresión de la enzima como su actividad reducida, provoca hiperhomocisteinemia, la cual se ha descrito como un factor de riesgo para la preeclampsia y como un promotor de la disfunción endotelial en la enfermedad de microvascularización placentaria. En una población caucásica, se obtuvo que el genotipo *MTHFR* A1298C tenía 1.6 veces más probabilidades de sufrir preeclampsia (OR = 1.6, IC 95%: 1-2.5);  $p = 0.02$ ), el genotipo *MTHFR* 677T homocigoto TT se asoció con la preeclampsia de inicio temprano (OR = 1.9, IC 95% 1-3.7;  $p = 0.047$ ), mientras que para el alelo *MTHFR* 1298C AC + CC (OR = 3.4, IC del 95%: 1.7-6.8);  $p = 0.001$ ) se asoció al desarrollo de preeclampsia. Se observó una interacción significativa entre los alelos *MTHFR* C677T y *MTHFR* A1298C (OR 6.3, IC 95%: 2.5-14.7;  $p = 0.002$ ) para el riesgo de preeclampsia (Salimi et al, 2015); así mismo, se evaluaron en una población hispanoamericana los mismos polimorfismos y se obtuvo, que el genotipo CC mutante del polimorfismo A1298C, se asoció a un mayor riesgo de presentar preeclampsia (OR: 25.3, IC 95%: 3.53-512.4;  $p = 0.0001$ ) (Chedraui et al., 2014).

En un metanálisis de 51 estudios, detectaron asociaciones significativas entre el polimorfismo *MTHFR* C677T y el riesgo de preeclampsia en la población general para TT vs. CC (OR = 1.280, IC 95%: 1.074-1.525); en una población caucásica para el modelo dominante (OR = 1.136, IC 95%: 1.022 - 1.263), y en una población de Asia oriental para TT frente a CC (OR 2.199, IC 95%: 1.366-3.924); no se detectaron asociaciones en América Latina, el sur de Asia y las poblaciones de África (Wang et al., 2013). Dos años más tarde, un metanálisis de 54 estudios, donde se evaluaron 7398 casos y 11 230 controles para *MTHFR* C677T, reporta una asociación

para riesgo de preeclampsia T vs C (OR = 1.157, IC 95%: 1.057-1.266; p = 0.002), TT + CT vs CC (OR = 1.165, IC 95%: 1.049-1.293; p = 0.004), TT vs CT + CC (OR = 1.371, IC 95%: 1.163-1.63; p <0,001) para población caucásica y asiática (Wu et al., 2015). Mientras tanto, en un estudio reciente reporta que el alelo menor (G) del SNP intrónico rs17367504 en el gen *MTHFR*, se asoció con un efecto protector sobre la preeclampsia (OR = 0.65, IC del 95% 0.53-0.80) en población noruega (Thomsen et al., 2017). Al analizar una asociación entre el SNP *MTHFR* 677T y *GSTP1* 313G (genotipo GG y AG) en una población mestiza, señala un riesgo significativamente menor de presentar preeclampsia (OR = 0.266, IC 95%: 0.115-0.705; p = 0.007) y (OR = 0.316; IC 95%: 0.134-0.744; p = 0.008) respectivamente (Canto et al., 2008). En Polonia, se observó una mayor frecuencia del genotipo 66GG y el alelo 66G del polimorfismo *MTRR* 66A>G en las mujeres con preeclampsia (Seremak et al., 2017). Es interesante resaltar el contraste de éstos resultados, ya que establece la importancia de la heterogeneidad del grupo étnico correspondiente.

### Catecol-O-metiltransferasa (COMT)

La catecol-O-metiltransferasa (COMT), es una enzima que cataliza la O-metilación de diversas hormonas circulantes, como las catecolaminas y los catecol estrógenos. Metaboliza ciertas formas de estradiol circulante a 2-metoxiestradiol (2-ME). La invasión citotrofoblástica está modulada por 2-ME durante condiciones hipóxicas (Hernandez et al., 2013). El gen de COMT se localiza en el cromosoma 22q11.21.

El polimorfismo COMT G675A (rs4680) se ha asociado con preeclampsia. Se reporta un riesgo de preeclampsia para MET/Met de COMT fetal (OR = 3.22, 95% CI 1.01-10.28) y (OR of 8.65 (95% CI 1.21-61.60) para TT *MTHFR* fetal en población caucásica (Pertegal et al., 2016). En tanto un metanálisis reciente realizado en Irán, que incluyeron 6 estudios con 2596 casos y 4223 controles, los resultados indican, que el polimorfismo COMT Val158Met se asoció significativamente con el aumento del riesgo de preeclampsia en el genotipo recesivo (AA vs AG + GG: OR = 1.522, IC 95%: 1.089 - 2.127; p = 0.014) y genotipo dominante (AA vs. GG: OR = 1.605, IC 95%: 1.102 - 2.336; p = 0.014) (Taravati et al., 2017). Así mismo, en México, se encontró un riesgo para preeclampsia para el genotipo AA de COMT G675A (OR: 2,69, IC 95%: 1.00 a 7.22), la interacción entre los genotipos

COMT 675AA y MTHFR 677TT potencian el riesgo (OR: 5.21, IC 95%: 1.12-24.3;  $p = 0.019$ ) (Vazquez et al., 2014). Contrariamente a lo reportado en una población asiática, no se encontraron diferencias significativas con la presencia de estos polimorfismos con el riesgo de preeclampsia (Zhao et al., 2016).

### Cistationina-b-sintasa (CBS)

La cistationina-b-sintasa (CBS) es una enzima clave en la vía de transulfuración, que cataliza la primera etapa limitante de la velocidad mediante la conversión de la homocisteína en cistationina, también está involucrado en la desulfuración de L-cisteína en sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ); éste último implicado en la regulación del tono vascular, la proangiogénesis, la modulación del sistema inmune y puede actuar como un antioxidante (Stipanuk y Ueki, 2011).

Las placentas preeclámpicas de inicio temprano muestran una expresión disminuida del gen CBS. En una población caucásica, los SNP rs12329764, rs2851391, rs234713, rs234706, rs1789953 y rs11203172 del gen CBS, se asociaron con el riesgo significativamente menor de preeclampsia en mujeres heterocigóticas; para rs11203172 (OR 0.253, IC 95% 0.091-0.702;  $p = 0.008$ ). Las mujeres que portan el alelo minoritario T (TT/TG combinado) del SNP de CBS rs11203172 tuvieron un riesgo significativamente menor de desarrollar preeclampsia de inicio temprano (OR 0.267, IC 95% 0.101-0.702;  $p = 0.007$ ) (Holwerda et al., 2016).

### Proteína de crecimiento específico de detención 6 (GAS6)

La proteína de crecimiento específico de detención 6 (GAS6) es una proteína plasmática dependiente de vitamina K, ha sido implicado en la inflamación sistémica y la coagulación, y recientemente en el riesgo de preeclampsia. El gen que codifica la GAS 6 se ubica en el cromosoma 13q34.

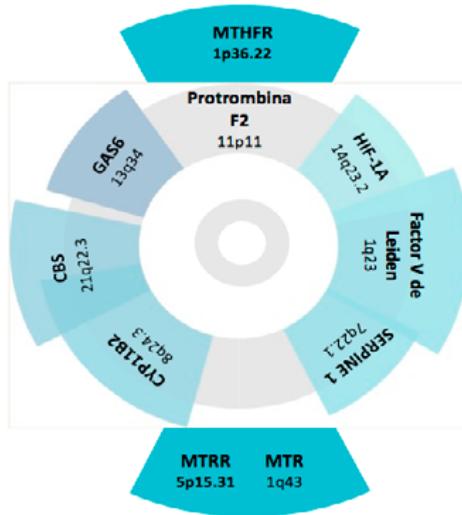
De acuerdo a lo descrito en una población asiática, se repora una asociación de los polimorfismos de nucleótido único del gen GAS6 (GAS6 834 +7G/A) rs8191974 y +1332C/T rs1803628 con la gravedad de la preeclampsia. El genotipo +1332

TT resultó ser protector del desarrollo de preeclampsia (OR = 0.271, IC del 95% 0.077-0.953; p = 0.03), en tanto que el genotipo TT del GAS6 +1332C/T confiere un riesgo de preeclampsia grave (OR = 0.597, IC del 95% 0.416-0.855; p = 0.01) (Ye et al., 2017).

### Factor inducible de hipoxia-1a (HIF-1a)

El factor inducible de hipoxia-1a HIF-1a (por sus siglas en inglés, Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ ), se expresa en la placenta humana en temprana del embarazo y es un mediador clave de las respuestas de hipóxica e inflamación; regula la expresión de los factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular, implicados en el desarrollo de la vasculatura placentaria (Rey y Semenza, 2010). El HIF-1a se localiza en el cromosoma 14q23.2. Se ha relacionado un efecto protector del SNP HIF-1a rs11549465 y el alelo T en el desarrollo de preeclampsia (OR = 0.3, IC del 95% 0.1-0.7; p = 0.002) y en preeclampsia de inicio temprano (OR = 0.3, IC del 95% 0.1-0.7; p = 0.006) (Andraweera et al., 2014).

Figura 2. Genes implicados en las trombofilias y metabolismo en el embarazo relacionados con el riesgo de preeclampsia

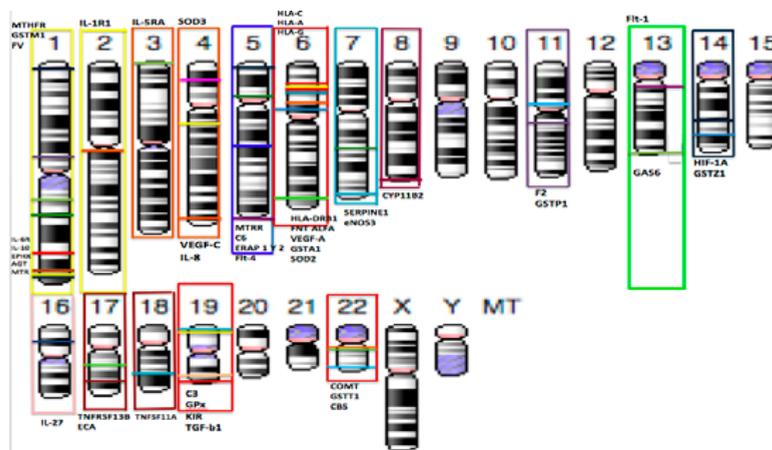


MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa), MTR (metionina sintasa) y la MTRR (metionina sintasa reductasa), cistationina-b-sintasa (CBS), Factor inducible de hipoxia-1a (HIF-1a)  
Elaboración propia.

### Localización cromosómica de los genes reportados en asociación con preeclampsia

Se realizó una localización cromosómica de cada gen utilizando la base de datos NCBI. Se presentan regiones de alta densidad en los cromosomas implicados en la preeclampsia, algunos de ellos descritos en la literatura: 6p, 9q, 11p y 19q (Jebbink et al., 2012). En esta revisión de los últimos 10 años se identifican 4 cromosomas que contienen una mayor cantidad de genes implicados en la patogénesis de la preeclampsia como el cromosoma 1 que incluye genes de expresión inmunológica y genes de la función endotelial predominantemente, así como el cromosoma 5. El cromosoma 6 que alberga en su mayoría genes del HLA, específicamente al miembro de la molécula de HLA clase I MHC, genes relacionados al estrés oxidativo y genes implicados en la función endotelial; por último encontramos al cromosoma 19.

Figura 3. Localización cromosómica de los genes con asociación a preeclampsia



Elaboración propia.

### DISCUSIÓN

La preeclampsia es un trastorno multisistémico y multifactorial complejo con un componente genético poco claro. En la presente revisión se evaluó el papel de los polimorfismos genéticos en la preeclampsia; se describen y presentan 45 genes, en

su mayoría incluidos en 4 principales cromosomas que se han asociado y centrado en el papel que desempeñan en la fisiopatogénesis de la preeclampsia: disfunción endotelial, estrés oxidativo y trombosis placentaria.

Particularmente, se observó que la población mayormente estudiada ha sido la caucásica, así como la asiática. De manera particular al papel que desempeñan los polimorfismos de los genes mencionados, la mayoría de ellos, expresa un riesgo positivo para el desarrollo de preeclampsia en una etapa temprana del embarazo, algunos otros relacionados con una etapa tardía. Hay estudios de asociación entre los genes involucrados, con incremento para el riesgo de preeclampsia. Así mismo, se describen genes que confieren un efecto protector para este síndrome inflamatorio multisistémico. De acuerdo a lo anterior se establece la importancia de la heterogeneidad de cada grupo étnico correspondiente, aunado a la diferente expresión genética en las poblaciones que explican la base de la gran diversidad genética entre las mismas. El resultado de identificación de los loci de susceptibilidad de la preeclampsia, ofrece la posibilidad de aplicar un análisis de ligamiento amplio del genoma donde se pueden identificar los loci de susceptibilidad y los genes candidatos.

## CONCLUSIÓN

Diversos estudios en diferentes poblaciones han identificado polimorfismos maternos asociados con la preeclampsia a través de enfoques de genes candidatos. Se considera de suma importancia la identificación de las interacciones o estudios de asociación entre los genotipos fetal y materno, el efecto de los factores ambientales y la epistasia genética dentro del protocolo de estudio para determinar el riesgo potencial de preeclampsia predominantemente en la etapa temprana en poblaciones susceptibles.

La identificación de genes candidatos, ofrecen la posibilidad de la obtención de un perfil genético de estudio potencial de investigación para cada población, que conduzca a una mejor orientación para establecer el riesgo potencial para el desarrollo de preeclampsia y un tratamiento dirigido a embarazos de alto riesgo.

## REFERENCIAS

- Aguilar Duran, M.; Salvador Moysén, J.; Galaviz Hernandez, C.; Vázquez Alaniz, F.; Sandoval Carrillo, A. A.; Velázquez Hernández, N. y Salas Pacheco, J. M. (2014). Haplotype analysis of TGF- $\beta$ 1 gene in a preeclamptic population of northern Mexico. *Pregnancy Hypertension* [en línea], 4 (1), 14-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2013.07.007>
- Alaa, H. M.; Seleem, A. K.; Shaalan, D.; Elaziz El-Refaeey, A.; Shalaby, H. y Al-Hussaini, A. S., 2015. Polymorphism in Glutathione S-Transferase P1 and Manganese- Superoxide Dismutase Genes in Egyptian Women with Preeclampsia. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences Ver* [en línea]. III, 10 (1), 2319-7676. Disponible en: <https://doi.org/10.9790/3008-10132026>
- Andraweera, P. H.; Dekker, G. A.; Thompson, S. D.; Dissanayake, V. H. W.; Jayasekara, R. W. y Roberts, C. T., 2014. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene polymorphisms in early and late onset preeclampsia in Sinhalese women. *Placenta* [en línea], 35 (7), 491-495. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.04.008>
- Anvar, Z.; Saadat, I.; Namavar-jahromi, B. y Saadat, M., 2011. Original article: Genetic polymorphisms of Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) and susceptibility to pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *Methods*, 1, 44-51.
- Arenas, D. y Mesa, C. C., 2008. Genética de la preeclampsia Genetics of preclampsia. *Rev CES Med* [en línea], 22 (2), 57-67. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2611/261120994006.pdf>
- Barbosa, P. R.; Stabler, S. P.; Machado, A. L. K.; Braga, R. C.; Hirata, R. D. C.; Hirata, M. H.; ... Guerra-Shinohara, E. M., 2008. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *European Journal of Clinical Nutrition* [en línea], 62 (8), 1010-1021. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602810>
- Canto, P.; Canto-Cetina, T.; Juárez, R.; Rosas, H.; Rangel, H.; Canalizales, S.; Coral, R., 2008. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and Glutathione S-Transferase P1 A313G Are Associated with a Reduced Risk of Preeclampsia in Maya-Mestizo Women. *Hypertension Research* [en línea], 31 (5), 1015-1019. Disponible en: <https://doi.org/10.1291/hypres.31.1015>

- Carrillo, R. y Sánchez, M.J., 2013. Bases moleculares de la preeclampsia-eclampsia. *Rev Invest Med Sur Mex* [en línea], 20 (2), 103-109. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms132d.pdf>
- Chedraui, P.; Salazar-Pousada, D.; Villao, A.; Escobar, G. S.; Ramirez, C.; Hidalgo, L.; ... Simoncini, T., 2014. Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T and A1298C) in nulliparous women complicated with preeclampsia. *Gynecological Endocrinology* [en línea], 30 (5), 392-396. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/09513590.2014.895807>
- Chen, H.; Zhao, G.; Sun, M.; Wang, H.; Liu, J.; Gao, W. y Meng, T., 2012. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and Preeclampsia: Meta-Analysis of 18 Case-Control Studies. *DNA and Cell Biology* [en línea], 31 (6), 1136-1145. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1406>
- Chen, P.; Gong, Y.; Pu, Y.; Wang, Y.; Zhou, B.; Song, Y.; ... Zhang, L., 2016. Association between polymorphisms in IL-27 gene and pre-eclampsia. *Placenta* [en línea], 37, 61-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.11.003>
- Cheng, D.; Hao, Y.; Zhou, W. y Ma, Y., 2013. Vascular endothelial growth factor +936C/T, -634G/C, -2578C/A, and -1154G/A polymorphisms with risk of preeclampsia: A meta-analysis. *PLoS ONE* [en línea], 8 (11). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078173>
- Dai, B.; Liu, T.; Zhang, B.; Zhang, X. y Wang, Z., 2013. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene* [en línea], 519 (1), 187-193. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.004>
- Dávalos, I. P.; Moran, M. C.; Martínez Abundis, E.; González Ortiz, M.; Flores Martínez, S. E.; Machorro, V.; ... Salazar Páramo, M., 2005. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [en línea], 35 (1), 66-69. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.008>
- Deepthi, G., Chaitri, P. K., Latha, P., Usha Rani, V., Rahman, P. F., y Jahan, P. (2015). TGFB1 Functional Gene Polymorphisms (C-509T and T869C) in the Maternal Susceptibility to Pre-eclampsia in South Indian Women. *Scandinavian Journal of Immunology* [en línea], 82 (4), 390-397. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/sji.12342>

- Dobó, J.; Schroeder, V.; Jenny, L.; Cervenak, L.; Závodszy, P. y Gál, P., 2014. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. *Molecular Immunology*, 61 (2), 69-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.013>
- Espelin, S. M.; Bardett, M.; Fraser, A.; Kerber, R.; Geri, M.; Jorge, C. y VRNAer., M. W., 2001. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, 344 (17), 1263-1269.
- Fan, D. M; Wang ,Y; Liu, X. L, y Zhang A., X. Q., 2017. Polymorphisms in interleukin-6 and interleukin-10 may be associated with risk of preeclampsia. *Genetics and Molecular Research* [en línea], 16 (1). Disponible en: <https://doi.org/10.4238/gmr16018588>
- Faraci, F. M. y Didion, S. P., 2004. Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [en línea], 24 (8), 1367-1373. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133604.20182.cf>
- Garza, I.; Castruita, C.; Cortes, R.; Martinez, V.; Rivera, J. E.; Garcia, E. A.; ... Martinez, M. L., 2011. No association between polymorphisms/haplotypes of the vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 11 [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2393-11-35>
- Giannakou, K.; Evangelou, E. y Papatheodorou, S. I., 2018. Genetic and non-genetic risk factors for pre-eclampsia : umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies [en línea], (October 2017), 720-730. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/uog.18959>
- Guan, L.; Fan, P.; Liu, X.; Liu, R.; Chen, Y.; Ye, L.; ... Bai, H., 2016. Association study between GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and risk of preeclampsia in Chinese population. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* [en línea], 204, 31-35. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.07.491>
- Hayes, J. D. y Strange, R. C., 2000. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* [en línea], 61 (3), 154-166. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000028396>
- Hernandez, M.; Hernandez, I.; Rodriguez, F.; Pertegal, M.; Bonacasa, B.; Salom, M. G.; ... Fenoy, F. J., 2013. Endothelial dysfunction in gestational hypertension induced by catechol-O-methyltransferase inhibition. *Experimental Physiology* [en línea], 98 (3), 856-866. Disponible en: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.067389>

- Hiby, S. E.; Walker, J. J.; O'Shaughnessy, K. M.; Redman, C. W. G.; Carrington, M.; Trowsdale, J. y Moffett, A. 2004. Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. *The Journal of Experimental Medicine* [en línea], 200 (8), 957-965. Disponible en: <https://doi.org/10.1084/jem.20041214>
- Hill, L. D.; Hilliard, D. S. D.; York, T. P.; Srinivas, S.; Kusanovic, J. P.; Gomez, R.; ... Strauss, J. F., 2011. Fetal ERAP2 variation is associated with preeclampsia in African Americans in a case-control study. *BMC Medical Genetics* [en línea], 12, 10-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-64>
- Hoffman, M. C.; Rumer, K. K.; Kramer, A.; Lynch, A. M. y Winn, V. D., 2014. Maternal and fetal alternative complement pathway activation in early severe preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)* [en línea], 71(1), 55-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/aji.12162>
- Holwerda, K. M.; Weedon-Fekjær, M. S.; Staff, A. C.; Nolte, I. M.; Van Goor, H.; Lely, A. T. y Faas, M. M., 2016. The association of single nucleotide polymorphisms of the maternal cystathionine- $\beta$ -synthase gene with early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypertension* [en línea], 6 (1), 60-65. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2015.12.001>
- Lokki, A.; Kaartokallio, T.; Holmberg, V.; Onkamo, P.; Koskinen, L. L. E.; Saavalainen, P.; ... Meri, S., 2017. Analysis of complement C3 gene reveals susceptibility to severe Preeclampsia. *Frontiers in Immunology* [en línea], 8 (May), 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00589>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2017. *Defunciones para calcular la razón de la mortalidad materna* [en línea]. Aguascalientes, México. Disponible en: <http://www.unwomen.org/es/what-we-do/economic-empowerment>.
- Lorio, A.; Spinelli, M.; Polimanti, R.; Lorenzi, F.; Valensise, H.; Manfellotto, D. y Fuciarelli, M., 2015. GSTA1 gene variation associated with gestational hypertension and its involvement in pregnancy-related pathogenic conditions. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* [en línea], 194, 34-37. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.08.006>
- Jebbink, J.; Wolters, A.; Fernando, F.; Afink, G.; Van der Post, J. y Ris-Stalpers, C., 2012. Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome-A review. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* [en línea], 1822 (12), 1960-1969. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.004>

- Johnson, M. P.; Roten, L. T.; Dyer, T. D.; East, C. E.; Blangero, J.; Brennecke, S. P.; ... Moses, E. K., 2010. The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Hum Genet* [en línea], 126 (5), 655-666. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0714-x>.The
- Karakus, S.; Bagci, B.; Bagci, G.; Sancakdar, E.; Yildiz, C.; Akkar, O. y Cetin, A., 2017. SDF-1/CXCL12 and CXCR4 gene variants, and elevated serum SDF-1 levels are associated with preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* [en línea], 36 (2), 124-130. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10641955.2016.1250904>
- Keshavarzi, F.; Mohammadpour Gharehbagh, A.; Shahrakipour, M.; Teimoori, B.; Yazdi, A.; Yaghmaei, M.; ... Salimi, S., 2017. The placental vascular endothelial growth factor polymorphisms and preeclampsia/preeclampsia severity. *Clinical and Experimental Hypertension* [en línea], 39 (7), 606-611. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1299751>
- Khani, M.; Amani, D.; Taheripanah, R.; Sanadgol, N.; Feizollahzadeh, S. y Rahmani, Z., 2015. Transforming growth factor beta-1 (TGF-1) gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) and susceptibility to pre-eclampsia in Iranian women: A case-control study. *Pregnancy Hypertension* [en línea], 5 (4), 267-272. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2015.01.002>
- Kusmierska, R. K. y Katarzyna, H. H., 2015. Associations of ACE I / D and AGT M235T Gene Polymorphisms with the Gestational Hypertension and the Fetal Growth. *Journal, Gynecology International* [en línea], 2 (1), 1-6. Disponible en: <https://doi.org/10.15406/ogij.2015.02.00026>
- Lin, R.; Lei, Y.; Yuan, Z.; Ju, H. y Li, D., 2012. Angiotensinogen Gene M235T and T174M Polymorphisms and Susceptibility of Pre-Eclampsia: A Meta-Analysis. *Annals of Human Genetics* [en línea], 76 (5), 377-386. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2012.00722.x>
- Liu, B.; Li, Y.; Yao, Y.; Li, H.; Liang, H.; Xin, M.; ... Liu, S., 2016. Polymorphisms of the IL27 gene in a Chinese Han population complicated with pre-eclampsia. *Scientific Reports* [en línea], 6 (September 2015), 1-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep23029>
- Matsubara, K.; Higaki, T.; Matsubara, Y. y Nawa, A., 2015. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], 16 (3), 4600-4614. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms16034600>

- Medica, I.; Kastrin, A. y Peterlin, B., 2007. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: A meta-analysis. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.10.005>
- Moreau, P.; Contu, L.; Alba, F.; Lai, S.; Simoes, R.; Orrù, S.; ... Carosella, E. D., 2008. HLA-G Gene Polymorphism in Human Placentas: Possible Association of G\*0106 Allele with Preeclampsia and Miscarriage. *Biology of Reproduction* [en línea], 79 (3), 459-467. Disponible en: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068874>
- Morgan, J. A., Bombell, S. y Mcguire, W., 2013. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 Systematic Review [en línea], 8 (2). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056907>
- Mütze Sabine, R.S.; Rudnik, S. y Zerres, K., 2008. Genes and the preeclampsia syndrome. *Journal of Perinatal Medicine* [en línea], 36 (1), 38-58. Disponible en: <https://doi.org/10.1515/JPM.2008.004>
- Nakimuli, A.; Chazara, O.; Hiby, S. E.; Farrell, L.; Tukwasibwe, S.; Jayaraman, J.; ... Moffett, A., 2015. A *KIR B* centromeric region present in Africans but not Europeans protects pregnant women from pre-eclampsia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], 112(3), 845-850. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.1413453112>
- Pabalan, N.; Jarjanazi, H.; Sun, C. y Iversen, A.C., 2015. Meta-analysis of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) 14 bp insertion/deletion polymorphism as a risk factor for preeclampsia. *Tissue Antigens* [en línea], 86 (3), 186-194. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/tan.12627>
- Peng, X.; Lin, Y.; Li, J.; Liu, M.; Wang, J.; Li, X.; ... Liu, S., 2016. Evaluation of Glutathione Peroxidase 4 role in Preeclampsia. *Scientific Reports* [en línea], 6 (May), 4-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep33300>
- Pertegal, M.; Fenoy, F. J.; Hernández, M.; Mendiola, J.; Delgado, J. L.; Bonacasa, B.; ... Hernández, I., 2016. Fetal Val108/158Met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and placental COMT activity are associated with the development of preeclampsia. *Fertility and Sterility* [en línea], 105 (1), 134-143e3. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.019>
- Procopciuc, L. M.; Caracostea, G.; Nemeti, G.; Drugan, C.; Olteanu, I. y Stamatian, F., 2012. The Ala-9Val (Mn-SOD) and Arg213Gly (EC-SOD) polymorphisms in the pathogenesis of preeclampsia in Romanian women: Association with the severity and outcome of preeclampsia. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* [en línea], 25 (7), 895-900. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.599078>

- Rajakumar, A.; Chu, T.; Handley, D. E.; Bunce, K. D.; Burke, B.; Hubel, C. A.; ... Peters, D. G., 2011. Maternal gene expression profiling during pregnancy and preeclampsia in human peripheral blood mononuclear cells. *Placenta* [en línea], 32 (1), 70-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.10.004>
- Rey, S. y Semenza, G. L., 2010. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular Research* [en línea], 86 (2), 236-242. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq045>
- Roberts, J. M.; Druzin, M.; August, P. A.; Gaiser, R. R.; Bakris, G.; Granger, J. P.; ... Sibai, B. M., 2013. *ACOG Guidelines: Hypertension in pregnancy. American College of Obstetricians and Gynecologists* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/doi:10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88>
- Rodríguez, C., 2017. Actualidades en el manejo de la preeclampsia. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 40, 19-21.
- Rosta, K.; Molvarec, A.; Enzsöly, A.; Nagy, B.; Rónai, Z.; Fekete, A.; ... Vér, Á., 2009. Association of extracellular superoxide dismutase (SOD3) Ala40Thr gene polymorphism with pre-eclampsia complicated by severe fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* [en línea], 142 (2), 134-138. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.10.014>
- Saadat, M.; Anvar, Z.; Nammavar Jahromi, B. y Saadat, I., 2012. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase Z1 (GSTZ1) and susceptibility to bipolar disorder. *Psychiatry Research* [en línea], 198 (1), 166-168. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.09.002>
- Salimi, S.; Saravani, M.; Yaghmaei, M.; Fazlali, Z.; Mokhtari, M.; Naghavi, A. y Farajian-Mashhadi, F., 2015. The early-onset preeclampsia is associated with MTHFR and FVL polymorphisms. *Archives of Gynecology and Obstetrics* [en línea], 291 (6), 1303-1312. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3561-5>
- Sánchez, L. C., Prada, C. E., Riaño-Medina, C. E., y Lopez, M. (2014). Endothelial dysfunction and preeclampsia: Role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology* [en línea], 5 (Oct), 1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00372>
- Sandoval, A.; Aguilar, M.; Vázquez, F.; Castellanos, F. X.; Barraza, M.; Sierra, E.; ... Salas, J. M., 2014. Polymorphisms in the GSTT1 and GSTM1 genes are associated with increased risk of preeclampsia in the Mexican mestizo population. *Genetics and Molecular Research* [en línea], 13 (1), 2160-2165. Disponible en: <https://doi.org/10.4238/2014.January.17.3>

- Seidegard, E. G., 1997. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives* [en línea], 105 (SUPPL. 4), 791-799. Disponible en: <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s4791>
- Seremak, A.; Bogacz, A.; Deka, D.; Klejewski, A.; Wolski, H.; Drews, K., ... Czerny, B. (2017). The polymorphisms of methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) genes in pathogenesis of preeclampsia. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* [en línea], 30 (20), 2498-2504. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1254183>
- Sharma, D.; Trivedi, S. S. y Bhattacharjee, J., 2011. Oxidative stress and eNOS (Glu298Asp) gene polymorphism in preeclampsia in Indian population. *Molecular and Cellular Biochemistry* [en línea], 353 (1-2), 189-193. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0786-5>
- Small, H. Y.; Akehurst, C.; Sharafetdinova, L.; McBride, M. W.; McClure, J. D.; Robinson, S. W.; ... Delles, C., 2017. HLA gene expression is altered in whole blood and placenta from women who later developed preeclampsia. *Physiological Genomics* [en línea], 49 (3), 193-200. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00106.2016>
- Srinivas, S. K.; Morrison, A. C.; Andrela, C. M. y Elovitz, M. A., 2010. Allelic variations in angiogenic pathway genes are associated with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [en línea], 202 (5), 445.e1-445.e11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.040>
- Staines, E., Paez, C., Doyle, P., Dudbridge, F., Serrano, N. C., Ioannidis, J. P. A., ... Casas, J. P. (2012). Genetic association studies in pre-eclampsia: systematic meta-analyses and field synopsis, *International Journal of Epidemiology* [en línea], (November), 1764-1775. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ije/dys162>
- Stipanuk, M. H. y Ueki, I., 2011. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis* [en línea], 34 (June 2009), 17-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10545-009-9006-9>. Dealing
- Sun, L.; Mao, D.; Cai, Y.; Tan, W.; Hao, Y.; Li, L. y Liu, W., 2016. Association between higher expression of interleukin-8 (IL-8) and haplotype -353A/-251A/+678T of IL-8 gene with preeclampsia. *Medicine (United States)* [en línea], 95 (52), 1-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005537>

- Taravati, A.; Tohidi, F.; Moniri, M. y Kamali, K., 2017. Catechol-O-methyltransferase Gene Polymorphism (Val158Met) and Development of Pre-eclampsia. *Archives of Medical Research* [en línea], 48 (2), 180-186. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.03.006>
- Tavakkol, Z.; Reza, H.; Morteza, S.; Ganjali, R.; Tara, F.; Shapouri, A. y Afshari, T. Z., 2016. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1-  $\beta$  Polymorphisms in Pre-Eclampsia, *Iran.J.Immunol* [en línea], 1313 (1334), 309-316. Disponible en: [http://iji.sums.ac.ir/article\\_39282\\_dd5a9a756f751b19663f211ac11d7f47.pdf](http://iji.sums.ac.ir/article_39282_dd5a9a756f751b19663f211ac11d7f47.pdf)
- Thomsen, L. C. V., McCarthy, N. S., Melton, P. E., Cadby, G., Austgulen, R., Nygard, O. K., ... Iversen, A. C. (2017). The antihypertensive MTHFR gene polymorphism rs17367504-G is a possible novel protective locus for preeclampsia. *Journal of Hypertension*, 35(1), 132–139. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001131>
- Valencia, E. Y.; Canto-Cetina, T.; Romero, J. F.; Coral, R. M.; Canizales, S.; Coronel, A.; ... Canto, P., 2012. Analysis of Polymorphisms in Interleukin-10, Interleukin-6, and Interleukin-1 Receptor Antagonist in Mexican-Mestizo Women with Pre-eclampsia. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* [en línea], 16 (11), 1263-1269. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0181>
- Vazquez, F.; Lumbreras, M. I.; Sandoval, A. A.; Aguilar, M.; Méndez, E. M.; Barraza, M.; ... Salas, J. M., 2014. Association of COMT G675A and MTHFR C677T polymorphisms with hypertensive disorders of pregnancy in Mexican mestizo population. *Pregnancy Hypertension* [en línea], 4 (1), 59-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2013.11.002>
- Vural, P.; Degirmencioglu, S.; Saral, N. Y.; Demirkan, A.; Akgul, C.; Yildirim, G.; ... Eroglu, H., 2010. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms in preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* [en línea], 36 (1), 64-71. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2009.01111.x>
- Wang, X.; Bai, T.; Liu, S.; Pan, H. y Wang, B., 2014. Association between thrombophilia gene polymorphisms and preeclampsia: A meta-analysis. *PLoS ONE* [en línea], 9 (6). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100789>
- Wang, X. M.; Wu, H. Y. y Qiu, X. J., 2013. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and risk of preeclampsia: An updated meta-analysis based on 51 studies. *Archives of Medical Research* [en línea], 44 (3), 159-168. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.01.011>

- Wu, W.; Yang, H.; Feng, Y.; Zhang, P.; Li, S.; Wang, X.; ... Zhang, Y., 2016. Polymorphisms in complement genes and risk of preeclampsia in Taiyuan, China. *Inflammation Research* [en línea], 65 (10), 837-845. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0968-4>
- Wu, W.; Yang, H.; Feng, Y.; Zhang, P.; Li, S.; Wang, X.; ... Zhang, Y., 2017. Polymorphisms in inflammatory mediator genes and risk of preeclampsia in Taiyuan, China. *Reproductive Sciences* [en línea], 24 (4), 539-547. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1933719116660844>
- Wu, X.; Yang, K.; Tang, X.; Sa, Y.; Zhou, R.; Liu, J.; ... Tang, W., 2015. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for preeclampsia: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [en línea], 32 (5), 797-805. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0408-8>
- Ye, L.; Guan, L.; Fan, P.; Liu, X.; Liu, R.; Chen, J.; ... Bai, H., 2017. Association study between GAS6 gene polymorphisms and risk of preeclampsia in Chinese population. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* [en línea], 211, 122-126. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.02.014>
- Zeng, F.; Zhu, S.; Wong, M. C. S.; Yang, Z.; Tang, J.; Li, K. y Su, X., 2016. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. *Scientific Reports* [en línea], 6 (1), 23407. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep23407>
- Zhao, X.; Liu, J.; Zhao, C.; Ye, P.; Ji, J.; Wang, J.; ... Liu, S., 2016. Association between COMT Val158Met polymorphism and preeclampsia in the Chinese Han population. *Hypertension in Pregnancy* [en línea], 35 (4), 565-572. Disponible en: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1211677>



# EPIGENÉTICA EN CÁNCER: UNA OPORTUNIDAD PARA LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

*Jesús Enrique Sánchez Flores<sup>1</sup>*

*Enrique Morales Avila<sup>1\*</sup>*

*Jonnathan G. Santillán Benítez<sup>1</sup>*

*Hariz Islas Flores<sup>1</sup>*

La epigenética estudia los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica, pero que no involucran la modificación de la secuencia del DNA. Los mecanismos moleculares reconocidos, incluyen eventos como la metilación de DNA, modificaciones de las histonas y modificaciones postranscripcionales de los RNA no codificantes, eventos que permiten la activación o la represión de los genes y que están implicados en diversos procesos fisiológicos. Asociadas a las modificaciones en la expresión de los genes se integran señales extrínsecas provenientes del medio ambiente a la fisiología de los organismos, en este sentido la expresión diferencial del genoma regula los mecanismos epigenéticos. Un conocimiento más profundo de las modificaciones epigenéticas y mapas epigenéticos de cada tipo de enfermedad, permitirá diseñar mejores estrategias terapéuticas.

## INTRODUCCIÓN

La epigenética involucra el estudio de los procesos de control genético influenciado por factores diferentes al genoma propio del individuo sin modificar la secuencia del DNA, de forma que los cambios epigenéticos pueden regular el “encendido” o “apagado” de determinados genes que determinarán si la información se traduce a una proteína (Handel, Ebers y Ramagopalan, 2010; Adalsteinsson y Ferguson Smith, 2014).

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* enrimorafm@yahoo.com.mx

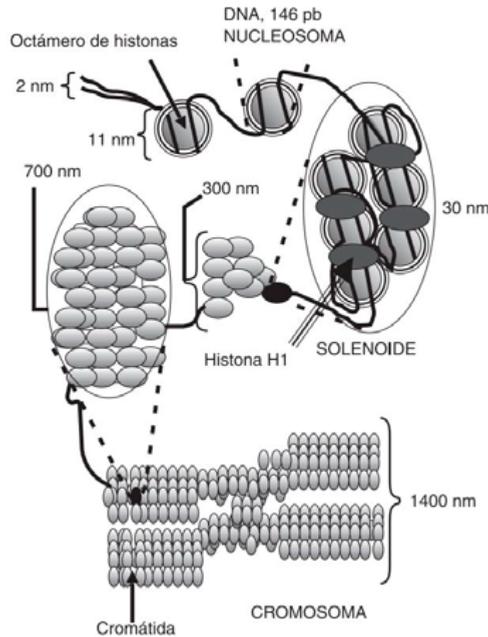
El término epigenética fue utilizado por primera vez en 1924 por el embriólogo y genetista Conrad Waddington, quien la definió como todas aquellas interacciones hereditarias casuales entre los genes, independientes a las alteraciones de la secuencia de DNA que dan como resultado la expresión fenotípica, esto es, la existencia de mecanismos moleculares que están por encima de los mecanismos genéticos (Horisawa et al., 2002; Goldberg, Allis y Bernstein, 2007; Hirst y Marra, 2009).

La adquisición progresiva del conocimiento del mecanismo molecular que determina la identidad celular, su regulación y revertido, el que diversos organismos tengan mecanismos moleculares comunes que contribuyen al control epigenético de la expresión del gen, una mayor comunicación entre diferentes ramas de la ciencia y la mayor disposición y generalización de la tecnología necesaria, entre otros, han contribuido a una enorme expansión de esta disciplina, siendo de interés en numerosos y aparentemente dispares campos de la ciencia. Si bien, a lo largo de 1995 se referenciaron 114 entradas en *PubMed* con el término epigenetic, a lo largo de 2016 se referenciaron 7.851 nuevas entradas (De la Torre, 2017).

En consenso actual el concepto se ha redefinido, siendo la epigenética todos los cambios heredables en la función de los genes sin que ocurran cambios en la secuencia del DNA. En un principio esta heredabilidad de la información epigenética se consideraba exclusiva de las células somáticas, sin embargo, se ha visto que las células gaméticas también heredan su información epigenética (Peedicayil, 2006; Goldberg, Allis y Bernstein, 2007; Handel, Ebers y Ramagopalan, 2010).

En la célula eucariota el DNA está empaquetado en el núcleo de forma altamente organizada (figura 1). El genoma humano tiene aproximadamente 3.000 millones de pares de bases (adenina, timina, guanina y citosina) de DNA y se organiza en 23 pares de cromosomas. Se estima que en el genoma humano hay unos 20.000-25.000 genes, la organización de la unidad básica y funcional de la cromatina la compone el nucleosoma, que contiene ocho proteínas histonas y DNA enrollado (145-147 pares de bases [pb]), las histonas han sido genéricamente denominadas como H1, H2A, H2B, H3 y H4. Los nucleosomas a su vez forman parte de otra estructura llamada cromatosoma, y cada cromatosoma empaqueta una media de 100 millones de pares de bases. Cada cromosoma es, por lo tanto, una larga cadena de nucleosomas (Corella y Ordovas, 2017).

Figura 1. Niveles de organización de la cromatina en una célula eucarionte



Fuente: Arenas Huertero y Rencillas Targa, 2002.

Podemos entender a la epigenética en un sentido amplio como el puente de unión entre el fenotipo y el genotipo, como aquello que cambia el resultado final de un locus o cromosoma, sin necesidad de cambiar la secuencia de DNA asociada a estos. Ejemplo de ello es la gran cantidad de células presentes en un organismo multicelular, donde a pesar de que todas las células comparten la misma información genética, durante el desarrollo del organismo se genera una amplia variedad de tipos celulares con expresión genética y funciones diferentes (Goldberg, Allis y Bernstein, 2007).

Durante el desarrollo celular el genoma es interpretado y traducido en el epigenoma (información en DNA e histonas), dando origen a una gran variedad de fenotipos lo que se conoce como plasticidad. En gran medida los factores ambientales juegan un papel importante, contribuyendo junto con los defectos genéticos al desarrollo de las enfermedades (Hirst y Marra, 2009).

En las células eucariotas los procesos o modificaciones epigenéticas son dirigidos mediante diversas vías. La primera corresponde a la metilación del DNA (figura

2a), la cual es de naturaleza binaria, es un proceso normal empleado por células de mamíferos, está implicado en la adecuada expresión de la información genética de los padres, en la inactivación del cromosoma X, entre otros eventos. El único factor epigenético que modifica directamente el DNA en mamíferos es la metilación del carbono 5 del anillo de citosina en los dinucleótidos simétricos CpG, modificación que afecta a una pequeña proporción –algo superior al 1%– de los restos de ácido citidílico, pero que implica que el 70-80% de los dinucleótidos CpG están metilados (Kim, Samaranyake y Pradhan, 2009; Kuroki y Tachibana, 2018).

El segundo proceso epigenético corresponde a las modificaciones en el código de histonas en la región N terminal de sus colas (figura 2b), estas modificaciones en el código de histonas, puedes ser al menos de 16 clases, entre las cuales se puede citar la acetilación, metilación, desaminación, sumoilación, fosforilación, ubiquitinización entre otra (tabla 1) (Bernstein, Meissner y Lander, 2007; Hirst y Marra, 2009; Handel, Ebers y Ramagopalan, 2010).

**Tabla 1. Modificaciones postraduccionales de la cromatina**

<i>Modificación/nomenclatura</i>	<i>Función</i>
Acetilación (lisina)/K-ac	Transcripción, reparación, replicación y condensación
Metilación (lisina)/K-me1, K-me2, K-me3	Transcripción y reparación
Metilación (arginina)/R-me1, R-me2s, R-me2a	Transcripción
Fosforilación (serina y treonina)/ S-ph, T-ph	Transcripción, reparación y condensación
Fosforilación (tirosina)/ Y-ph	Transcripción y reparación
Ubiquitinación/ K-ub	Transcripción y reparación
Sumoilación/ K-su	Transcripción y reparación
ADP ribosilación/ E-ar	Transcripción y reparación
Deiminación/ R→Cit	Transcripción y condensación
Prolina isomerización/P-cis ↔P-trans	Transcripción
Crotonilación/K-cr	Transcripción
Propionilación/ K-pr	Desconocido
Butirilación/ K-bu	Desconocido
Formilación/ K-fo	Desconocido
Hidroxilación/ Y-oh	Desconocido
O-GlcNacilación (serina y treonina)/ S-GlcNAc; T-GlcNAc	Transcripción

Elaboración propia

Se ha identificado un tercer mecanismo epigenético, mediado por moléculas de RNA altamente relacionadas (figura 2c), incluidos algunos RNA de interferencia de bajo peso molecular (siRNA) y los micro RNA (miRNAs). Evidencia actual indica que participan en complejos mecanismos que afectan el control de metilación, la modificación de histonas, formación de la estructura de la heterocromatina, entre otros mecanismos (De Smedt, 2018).

Actualmente, se sabe que la asociación entre cambios epigenéticos anormales como la hipermetilación del DNA, y las enfermedades tienen una importante relación, es posible observar que algunas alteraciones genéticas involucran un gen, mientras que en esa misma enfermedad las modificaciones epigenéticas pueden estar involucradas en la regulación de más de un gen (Li y Tollefsbol, 2016).

### Mecanismos de regulación epigenéticos

Los procesos epigenéticos tienen tres funciones principales en las células de los mamíferos, el primero de ellos es la contribución a la estabilidad de los cromosomas, lo que asegura su correcta segregación durante la mitosis, también contribuyen a la regulación en el silenciamiento e inactividad de elementos repetitivos y endógenos en el DNA y por último inician y mantienen actividad o supresión de genes o de grupos de ellos (Adalsteinsson y Ferguson Smith, 2014).

#### *Metilación del DNA*

La metilación del DNA es el proceso epigenético más ampliamente estudiado, consiste en la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al carbono en posición 5 de la citosina, esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas denominadas DNA-metiltransferasas (DNMTs), este proceso de metilación de la citosina se lleva a cabo comúnmente en ciertas zonas del DNA, donde la citosina se encuentra asociada a la guanina formando dinucleótidos que se repiten en múltiples ocasiones (CpG), formando regiones asimétricamente distribuidas de baja o alta densidad, estas últimas son llamadas islas CpG (Bernstein, Meissner y Lander, 2007).

En las células normales la metilación del DNA ocurre fundamentalmente en las secuencias repetitivas, incluido el DNA satélite, que no se transcriben. De hecho, hace tiempo que, gracias a los estudios sobre la inactivación del cromosoma X humano, se sabe que existe una relación causal entre metilación de DNA y silenciamiento de genes (Franco Vera, 2009).

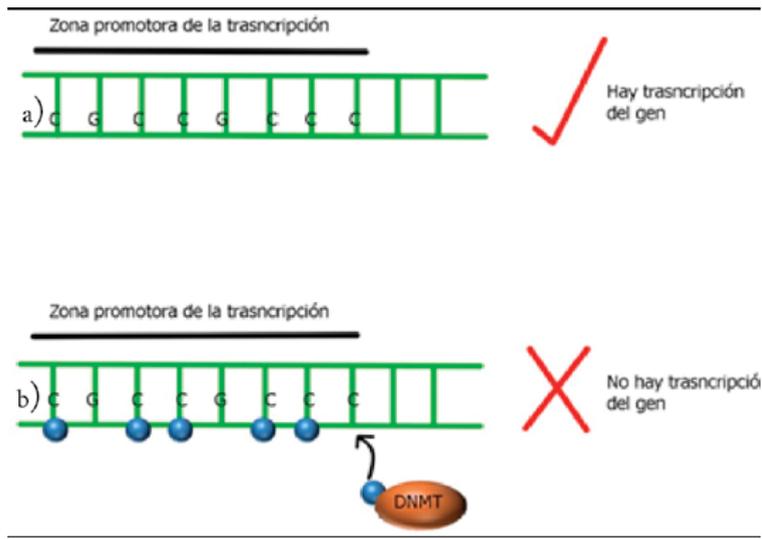
Las islas CpG se encuentran asociadas a promotores de transcripción de una gran cantidad de genes (figura 3), las islas CpG se mantienen normalmente desmetiladas, sin embargo, sitios esporádicos del DNA están normalmente metilados (menos del 4%). Las islas CpG se encuentran preferentemente en los extremos 5' del 60% de los genes humanos y su patrón de metilación difiere sustancialmente a la media del genoma. Mientras que la presencia de citosina metilada en el conjunto del genoma es proporcional a la abundancia de CpG, la mayoría de las islas CpG, por ejemplo, las que se encuentran en los promotores de genes constitutivos no están metiladas y por el contrario, la metilación de las islas CpG se relaciona con la represión transcripcional (Franco Vera, 2009; Gabory, Attig y Junien, 2011; Riley y Anderson, 2011).

La metilación del DNA cumple con una gran variedad de funciones como el silenciamiento de transposones, secuencias víricas, la represión en la transcripción de ciertos genes el desarrollo embrionario la transcripción y la impronta génica (Peedicayil, 2006; Hirst y Marra, 2009; Handel, Ebers y Ramagopalan, 2010).

La metilación de las islas CpG en regiones promotoras está generalmente asociada con el silenciamiento de genes, se ha demostrado que la metilación aberrante de genes provoca la aparición del cancer, debido al silenciamiento de genes supresores de tumores (Sato et al., 2011).

Se han descrito dos tipos de mecanismos mediante los cuales la metilación del DNA provoca la represión transcripcional. El primero implica la inhibición del reclutamiento de factores transcripcionales por la metilación del DNA. El segundo, más complejo, implica una relación entre metilación de DNA y desacetilación de histonas.

Figura 2. Representación de la metilación del DNA, en color azul pueden verse los grupos metilo transferidos por la DNMT en las zonas promotoras de la transcripción de los genes lo cual impide su expresión



Elaboración propia.

La DNA metiltransferasa (DNMT) es la enzima involucrada en el establecimiento y mantenimiento de la metilación del DNA. La familia de DNMT está constituida principalmente por las siguientes proteínas: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L. Tradicionalmente, DNMT1 ha sido considerada como una metiltransferasa de mantenimiento que copia los patrones de metilación del DNA de la cadena parental a la nueva cadena durante la división celular, mientras que DNMT3a y DNMT3b se conocen como metiltransferasas *de novo*, las cuales son altamente expresadas durante la embriogénesis y pobremente expresadas en tejidos adultos, mientras que DNMT3L se expresa durante la impronta en la embriogénesis y se acopla a DNMT3a para que se lleve a cabo la metilación. Actualmente, la función de la DNMT2 no es clara, aunque esta enzima se encuentra en altas concentraciones en el timo, la placenta y los testículos (Yoder y Bestor, 1998; Peedicayil, 2006; Bernstein, Meissner y Lander, 2007a; Kadayifci, Zheng y Pan, 2018).

## Modificaciones en el código de histonas

La existencia de una modificación de las histonas que tiene lugar después del evento de la traducción, las histonas pueden acetilarse reversiblemente, una reacción que afecta a algunas cadenas laterales de lisina, con la conversión del grupo amino, cargado positivamente a pH fisiológico, en un resto de acetamida carente de carga eléctrica.

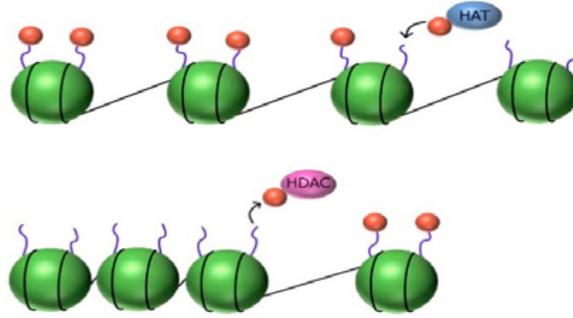
Las histonas son proteínas globulares las cuales se conocen 5 tipos (H1, H3, H4, H2A y H2B), de estas solo H3, H2A, H4 y H2B presentan dos pares de copias en las cuales el 146 pares de bases del AND se enrollan alrededor de estas para formar el nucleosoma (Hirst y Marra, 2009).

Se conocen al menos 16 modificaciones de histonas. Como resultado de esta diversidad y de las distintas combinaciones que se pueden realizar, existe un gran potencial de respuestas funcionales. Las modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas en ocasiones dan lugar a un cambio en la carga neta de los nucleosomas, afectando a las interacciones DNA-histona. Las modificaciones de las histonas tienen como resultado dos fenómenos: i) alteran la estructura de la cromatina mediante la modificación de interacciones no covalentes en los nucleosomas y entre estos (por ejemplo para abrir la cromatina en el caso la acetilación) y ii) interaccionan con proteínas o complejos proteicos efectores o transductores (Dawson y Kouzarides, 2012).

Entre los cambios en el código de histonas está la acetilación de las histonas H3 y H4, la cual se lleva a cabo por la enzima acetil transferasa de histonas (HAT por sus siglas en inglés) que catalizan la transferencia de los grupos acetilo hacia los residuos de lisina en las colas de estas histonas, lo que da como resultado la relajación de la cromatina al cambiar la polaridad del nucleosoma y por tanto las interacciones entre el DNA y las histonas (figura 2a), reclutando diversas proteínas reguladoras (Bernstein, Meissner y Lander, 2007; Li, Carey y Workman, 2007).

Este cambio en la condensación de la cromatina permite la transición de heterocromatina a eucromatina, así como el acceso a factores de transcripción. Esta modificación postraducciona es balanceada por la desacetilasa de histonas (HDAC, por sus siglas en inglés) (figura 3) (Bernstein, Meissner y Lander, 2007; Li, Carey y Workman, 2007).

Figura 3. La transferencia de grupos acetilo (color rojo) a los residuos de lisina (azul) mediada por la HAT favorece un estado relajado en la cromatina, mientras que la desacetilación de los residuos de lisina por parte de la HDAC crea un estado de compacto en la cromatina



Elaboración propia.

En el humano hay 18 HDAC conocidas, las cuales están separadas en cuatro clases. Clase I, Clase IIa, Clase IIb, Clase III y Clase IV, de las cuales las clases I, II y IV son proteínas dependientes de Zinc, mientras que la clase III requiere de NAD<sup>+</sup>.

Otro cambio postraduccional en el código de las histonas es la metilación de esta pero a diferencia de la acetilación, la metilación de las histonas tiene efectos variables sobre el estado de la cromatina, esto, en gran medida, es debido al residuo de lisina que es metilado en la cola de la histona, cuando la lisina 4 (K4) de la histona H3 es metilada la cromatina se relaja aumentando la actividad génica, por el contrario cuando se metila el residuo de lisina 9 (K9), de la misma histona se produce un estado de represión de la actividad génica al compactar la cromatina, se sabe que existe una considerable interrelación entre la metilación del DNA y las modificaciones en el código de las histonas, modificaciones como la metilación de las citosinas puede incrementar la metilación de H3-K9 de igual manera, la metilación de esta última puede promover la metilación de las citosinas. De forma concluyente, se asocia que, la metilación en la lisina 4 de H3 y en las argininas 17 de H3 y 3 de H4 está relacionada con la activación de la transcripción, mientras que la metilación de las lisinas 9 y 27 de H3 y 20 de H4 se relaciona con la represión o silenciamiento de genes.

De los datos experimentales disponibles, se admite que existe un código epigenético, que no se contrapone, sino que se superpone al código genético inscrito en el DNA, poniendo de manifiesto las potencialidades contenidas en los restantes

componentes de la cromatina. Una particularidad del código epigenético es la interrelación entre las diversas modificaciones de histonas y del DNA, por ejemplo, la metilación del DNA está relacionada con la desacetilación de histonas, gracias a la existencia de proteínas capaces de reconocer la metilcitosina y que, a su vez, reclutan histona desacetilasas. Esta interrelación es especialmente importante, por cuanto es la causa fundamental del silenciamiento de los genes, cuyos promotores están hipermetilados y está implicada en la represión de genes supresores de tumores, que tanta importancia tiene en el desarrollo del cáncer (Franco Vera, 2009).

## RNA

Los RNA de interferencia de bajo peso molecular (siRNA, por sus siglas en inglés) y los miRNA son considerados como un mecanismo epigenético postranscripcional que completan los dos mecanismos anteriores, estos siRNA son complementarios al RNA mensajero que al unirse favorecen la degradación de este último (Toyota y Issa, 2005).

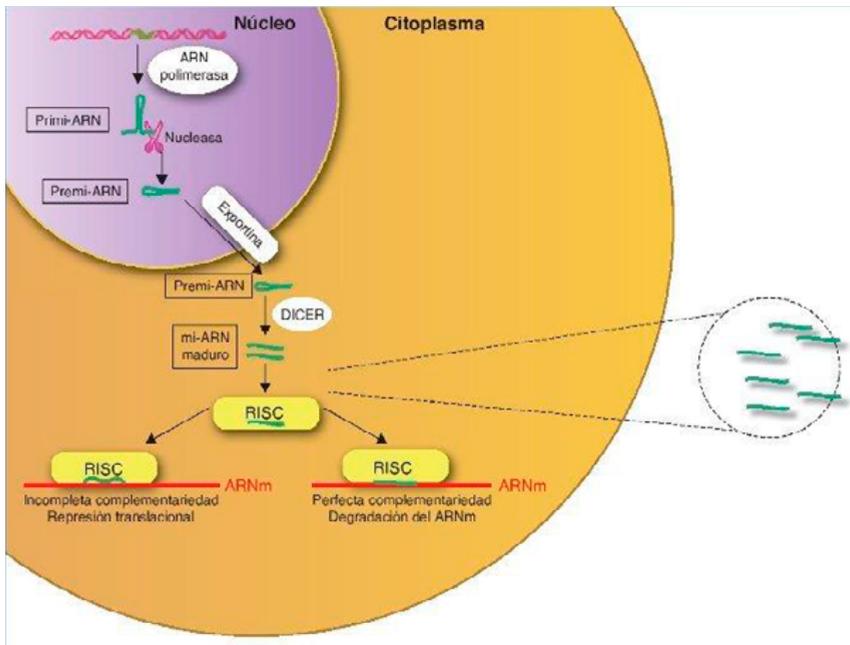
Se han identificado que los miRNA son fragmentos de RNA no codificante cercanos a los 22 nucleótidos, que regulan la expresión génica postraduccional, se sabe que algunos de ellos pueden intervenir como complementos del mRNA, sin embargo, su capacidad de incremento o supresión traduccional no está completamente elucidada, adicionalmente otro subtipo de miRNA está involucrado en el control de la expresión de importantes reguladores epigenéticos (De Smedt et al, 2018).

Se han descrito más de 1.000 mi-RNA, que se codifican en las regiones intergénicas o en los exones o intrones de genes codificantes de proteínas. El miRNA se sintetiza como un largo transcrito en el núcleo por la RNA polimerasa (figura 4). Posteriormente, es escindido por una RNAsa formando un precursor premi-RNA, que es transportado al citoplasma por una exportina para posteriormente ser procesado por una segunda RNAsa (Dicer). Dicer escinde el premi-RNA produciendo moléculas de 22 bp de doble cadena de mi-RNA. Una de las cadenas se unirá a RNA-inductor de silenciamiento o RISC (RNA-induced silencing complex) mientras que la cadena inactiva será degradada. El grado de complementariedad entre los mi-RNA y el RNAm será determinante como mecanismo regulador. Una perfecta

complementariedad con el RNAm provocará la fragmentación del RNAm, por el contrario, una unión imperfecta llevará a la represión translacional del RNAm, que posteriormente podrá ser degradado o bien traducido (De la Torre, 2017).

Esta complicada red de regulación y retroregulación entre los miRNA y los mecanismos epigenéticos parece ser un circuito complejo de regulación y organización de la expresión génica (Chuang y Jones, 2007; Sato et al., 2011).

Figura 4. Síntesis de los mi-RNA



Fuente: De la Torre, 2017.

Otro tipo de RNA involucrado en los mecanismos de regulación epigenética son los RNA no codificantes de Cadena larga (RNAInc), son definidos como cadenas largas de RNA (>200 pb) que no son codificantes debido a que no poseen un sitio de reconocimiento para su lectura. Se ha observado que están involucrados en la regulación de la impronta génica, esto lo hacen interfiriendo con los mecanismos de la transcripción de los genes, un ejemplo de esto es HOTAIR (gen humano localizado en el cromosoma 12, ejemplo de RNA expresado de un cromosoma que tiene influencia

en la transcripción de otro cromosoma), que está involucrado en el silenciamiento del cromosoma X y que también se ve altamente expresado en cánceres metastásicos de mama (Chen et al., 2013; Adalsteinsson y Ferguson Smith, 2014).

## Epigenética y cáncer

El papel de los mecanismos epigenéticos en las enfermedades humanas es conocido desde hace algunas décadas, en 1983 Feinberg y Vogelstein observaron correlación entre el desarrollo y alteraciones epigenéticas, principalmente metilación del DNA. Desde entonces, se han identificado numerosas enfermedades donde el control epigenético juega un papel importante, tal es el caso de la esquizofrenia (Peedicayil, 2006; Li y Tollefsbol, 2016).

Es bien conocido que en el cáncer existen múltiples anomalías genéticas como las mutaciones, deleciones, translocaciones, etc., que conllevan a la activación de oncogenes y de supresión de la función de múltiples genes supresores de tumores (Duenas Gonzalez et al., 2008), por ejemplo, en los melanomas la ganancia en el cromosoma 11p en la cual se encuentra el gen HRas promueve un aumento en el número de copias del mismo, mientras que la pérdida en el cromosoma 9p que resulta en la pérdida de expresión de p16 que regula la vía de ATP-asa HRas, involucrada en la regulación de la división celular (Bauer y Bastian, 2006).

En células normales la metilación del DNA provee un mecanismo estable de silenciamiento en la regulación de los genes, así como en la estructura de la cromatina, mientras que la mayoría de las regiones CpG en el genoma están metiladas, la mayoría de las islas CpG usualmente están desmetiladas durante el desarrollo y la diferenciación de tejidos, después de la diferenciación algunas islas CpG permanecen metiladas (Sharma, Kelly y Jones, 2010). Por su parte, el código de histonas determina la estructura y actividad en diferentes regiones de la cromatina. En otras palabras, casi todas las células en nuestro cuerpo tienen el mismo genotipo, sin embargo, presentan enormes diferencias en su fenotipo, esto en cierta medida se debe a las diferencias en el epigenoma en cada una de ellas (Handel, Ebers y Ramagopalan, 2010).

En el progreso y desarrollo del cáncer los mecanismos epigenéticos o alteraciones en estos mecanismos pueden dar como resultado una inapropiada activación o

inactivación de múltiples vías de señalización que dan como resultado el desarrollo de la enfermedad. En el cáncer los patrones epigenéticos se encuentran alterados de una manera aberrante, estos cambios o epimutaciones en conjunto con las alteraciones genéticas, juegan un papel importante en la iniciación y desarrollo del cáncer. El epigenoma del cáncer se caracteriza por cambios globales en la metilación del DNA y en los cambios postraduccional en el código de histonas, estos cambios resultan en una desregulación global en los patrones de expresión de los genes lo que conduce al desarrollo y progresión de la enfermedad, a diferencia de las células normales, las células cancerosas presentan una hipometilación global e hipermetilación regional en las islas CpG (Sharma, Kelly y Jones, 2010; Toh, Lim y Chow, 2017).

En el cáncer la hipometilación global en oncogenes y la hipermetilación en genes que se encuentran involucrados en el control de la proliferación celular, favorece la progresión del cáncer y el desarrollo de metástasis, estos procesos en conjunto actúan como mecanismo alterno a las mutaciones que inactivan genes supresores de tumor y activan oncogenes (Toyota y Issa, 2005b; Johnson et al., 2015).

Procesos malignos como el linfoma folicular se caracterizan por mutaciones recurrentes en las metiltransferasas de histonas MLL2 en cerca de un 80% de los casos. De manera similar, la UTX, una histona desmetilante se ha encontrada mutada en más de 12 tipos diferentes de cáncer. Estudios citogenéticos, así como los avances en los estudios genómicos de varios tipos de cáncer, han demostrado la aparición recurrente de translocaciones y mutaciones en el código de un largo número de enzimas metilantes o reguladoras de la metilación de DNA, reguladores de la modificación de histonas, metiltransferasas, desmetilasas, quinasas y complejos de remodelación de cromatina (también llamadas SWI/SNF, por sus siglas en inglés: *the switching defectivesucrose nonfermenting family*) (ver tabla 2) (Sen et al., 2017).

Las lesiones genéticas en los modificadores de la cromatina y las alteraciones globales en los mecanismos epigenéticos, no sólo están implicados en el papel causante del cáncer, proveen además un blanco para la intervención terapéutica (Marks, Olson y Fernandez Zapico, 2016).

**Tabla 2. Modificaciones epigenéticas y enfermedades relacionadas**

<i>Enzima</i>	<i>Mutación</i>	<i>Tumor</i>
Reguladores de metilación de DNA		
Metiltransferasas DNMT3A	C,D,S,E	LMA, EMP, SMD
Hidroximetilación y derivados TET1/ TET2	T/C,S,D	LMA/ LMA,EMP,SMD,LMMC
Reguladores de la modificación de histonas		
KAT3A(CBP)	C,T,S,D	LMA, LLA, LDCB, LNHB, CCT
KAT3B (p300)	C,T,S,D	LMA, LLA, LDCB, CCT, Colonorectal, mama, pancreático
KAT6A (MOZ)	T	LMA, SMD,
KAT6B (MORF)	T	LMA, leiomioma de útero
Modificaciones en Metiltransferasas		
KMT2A (MLL1)	T, TP	LMA, LLA, CCT
KMT2B (MLL2)	S, D, C	Meduloblastoma, LCBD, LF
KMT2C (MLL3)	S	Meduloblastoma, CCT, mama
KMT3A	C, D, S, E	Renal, mama
KMT3B	T	LMA
Modificaciones en Desmetilasas		
KDM5A	T	LMA
KDM5C	S, D, M	Renal
KDM6A	De, S, D, E	LMA, CCT, Renal, MM
Kinasas		
ATM	De, C, S, D, E	Meduloblastoma, glioma, LMA, LLA
JAK2	T, C	LMA, LLA, SMP
PIM1	T	LNH
Complejos remodeladores de cromatina (SWI/SNF)		
BRG1	S, D, C, De	Pulmón, meduloblastoma, mama, próstata, páncreas
ARID1A	S, D, C, T	Endometroide, renal, gástrico, mama, meduloblastoma
ARID1B	D, C, De	Mama
ARID2	S, D, E	Carcinoma hepatocelular
SNF5	S, D, De, E, T	Condrosarcoma, meningioma, sarcoma no diferenciado

C: contrasentido; D: desplazamiento de marco de lectura; S; sin sentido; E: Mutación de sitio de empalme; T: translocación; TP: translocación parcial de fragmento; De: delección LMA: Leucemia mieloide aguda, EMP: enfermedad mieloproliferativa; SMD: síndrome mielodisplásico, LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica, LLA: Leucemia linfocítica aguda; LDCB: Linfoma difuso de células B, LNHB: Linfoma no-Hodgkin de células B; LCBD: linfoma de células B grandes difusas; LF: linfoma folicular; CCT: carcinoma de células transicionales; CCT: carcinoma de células transicionales de vejiga urinaria; MM: mieloma múltiple, SMP: síndrome mieloproliferativo,

Elaboración propia.

## Tratamiento epigenético o epigenómica

A pesar de los grandes avances realizados en la secuenciación del genoma, el conocimiento de las variantes genéticas en el DNA no es suficiente para predecir el riesgo de enfermedad, ya que existen otros elementos reguladores más dinámicos, denominados epigenoma, que a su vez tienen capacidad para regular la expresión de las secuencias de DNA. La epigenómica es el estudio de los elementos funcionales clave que regulan la expresión génica en una célula. A diferencia del genoma, que es el mismo en todas las células somáticas, el epigenoma es específico de cada tipo celular, lo cual añade más complejidad al estudio y hace muy relevante el origen de la muestra que se ha tomado para el análisis (Corella y Ordovas, 2017).

El entendimiento de las consecuencias celulares entre la metilación normal y aberrante del DNA despierta un área de especial interés clínico, especialmente debido a que los agentes hipometilantes son una de las pocas modalidades terapéuticas que han ganado su aprobación por la FDA para su uso clínico, abriendo la posibilidad a nuevos fármacos epigenéticos (Kronfol et al., 2017).

Si muchas enfermedades tienen su origen patológico en una aberrante modificación en el patrón de metilación del DNA o en la modificación de las histonas, la tabla 3 muestra algunos tipos de cáncer y su relación con los mecanismos epigenéticos. Un medicamento que corrija estos defectos se llamaría legítimamente medicamento epigenético, hasta ahora los avances se centran en la búsqueda y aplicación de inhibidores de la metilación de DNA y fármacos acetiladores de histonas (Cramer, Adjei y Labhasetwar, 2015).

**Tabla 3. Tipos de cáncer y su relación con ejemplos de alteraciones epigenéticas**

<i>Cáncer</i>	<i>Alteraciones epigenéticas</i>
Colón	Hipermetilación de islas CpG, hipometilación genómica global, mutaciones en enzimas modificadoras de histonas
Mama	Hipermetilación de islas CpG, hipometilación genómica global
Pulmón	Hipermetilación de islas CpG, hipometilación genómica global, deleciones genómicas de elemento de respuesta AMC
Leucemia	Hipermetilación de islas CpG, mutaciones en enzimas modificadoras de histonas
Linfoma	Hipermetilación de islas CpG, disminución de histona H4 monoacetilada y trimetilada
Próstata	Hipermetilación de islas CpG, patrones aberrantes de modificación de histonas H3 y H4

Elaboración propia.

En el progreso y desarrollo del cáncer los mecanismos epigenéticos o alteraciones en estos mecanismos puede dar como resultado una inapropiada activación o inactivación de múltiples vías de señalización que dan como resultado el desarrollo de la enfermedad (Sharma, Kelly y Jones, 2010).

Por otro lado, la terapia epigenética tiene sus limitaciones, esto debido a que esta no actúa específicamente en una zona o sitio en particular, estas terapias actúan a nivel global ya sea inhibiendo las DNMTs o las HDAC que actúan en todo el genoma por lo que potencialmente pueden activar oncogenes debido a su falta de especificidad lo que resultaría en un rápido desarrollo del cáncer. Pese a esto el uso de fármacos que reviertan los procesos epigenéticos alterados han mostrado ser potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Peedicayil, 2006).

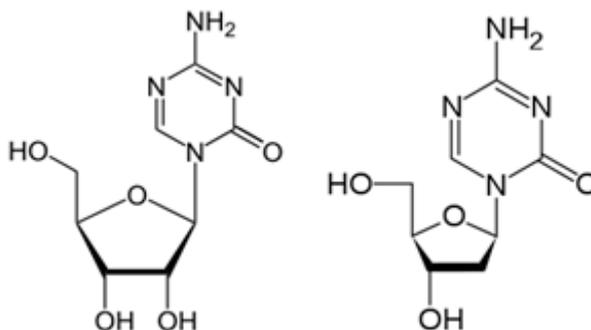
### *Inhibidores de la DNMT*

En el cáncer, la hipermetilación de las zonas promotoras de los genes involucrados en el control del desarrollo celular (GST), se ha identificado como un mecanismo epigenético bien establecido, por lo que el uso de inhibidores de la DNMT, los cuales no suelen ser específicos para alguna DNMT, en particular se ha investigado para reactivar estos genes que han sido silenciados, los inhibidores de la DNMT pueden ser divididos en tres grupos de acuerdo a su estructura (Graça et al., 2016).

### Inhibidores de la DNMT análogos a nucleótidos

Estos fármacos son análogos a la citosina la cual es metilada por las diferentes DNMTs, los principales fármacos de esta categoría son lacidina, y sus análogos, 5-azacitidina (5-aza-CR) y la decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina o 5-aza-CdR) y zebularina (figura 5), las cuales en un principio fueron desarrolladas como un agente citotóxico, estos fármacos, después de sufrir una fosforilación, son incorporados en la cadena de DNA durante la replicación en lugar de la citosina, esto hace que el grupo metilo de la SAM no pueda ser transferido al DNA por parte de las DNMTs, impidiendo así la metilación del DNA. Sin embargo, se ha visto que estos fármacos presentan varios efectos secundarios como hemorragia nasal, depresión o neutropenia debido a su mecanismo de acción (Yang et al., 2010).

Figura 5. 5-azacitidina (5-aza-CR) y la decitabina (5-aza-2'-deoxiciditina o 5-aza-CdR)

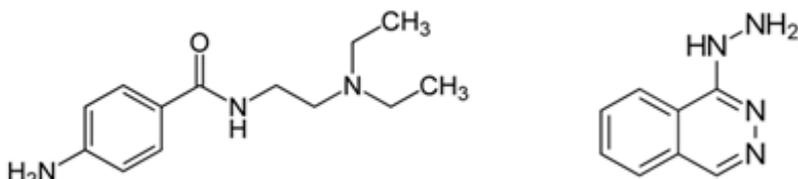


Elaboración propia.

### Inhibidores de la DNMT no análogos a nucleótidos

Los efectos mielotóxicos de los inhibidores de la DNMT análogos a nucleótidos, ha llevado a la búsqueda de inhibidores de la metilación del DNA que no se incorporen a la cadena del DNA, sino más bien inhiban de forma directa a las DNMT, impidiendo de esta manera que se lleva a cabo la transferencia del grupo metilo a la guanina (figura 6), ejemplo de estos fármacos es la procainamida o la Hidralazina (Duenas Gonzalez et al., 2008; Yang et al., 2010).

Figura 6. Procainamida e Hidralazina

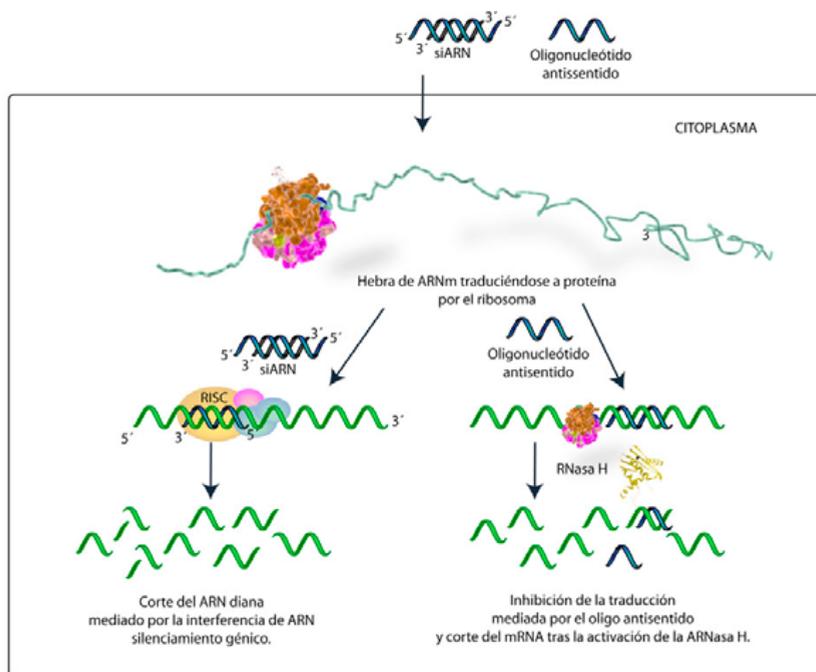


Elaboración propia.

## Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos son secuencias de nucleótidos que son complementarias al RNAm, que acoplan a esta haciendo que se inactive (figura 7), es por esto que se ha desarrollado oligonucleótidos antisentido que sean complementarios al RNAm de las DNMT, para que estas no sean expresadas y se produzca una hipometilación, dentro de este grupo podemos encontrar a MG98 que es un oligonucleótido antisentido de 20pb de longitud que se une específicamente a la región 3' del RNAm de la DNMT1 en humanos (Yang et al., 2010).

Figura 7. Representación del mecanismo del empleo de oligonucleótidos antisentido



3dciencia.com | Medical

Fuente: Medicamentos basados en arn.En línea: <https://flagellum.wordpress.com/2009/06/09/medicamentos-basados-en-RNA-silenciamiento-de-genes-especificos/>

## CONCLUSIÓN

La epigenética es una disciplina con un crecimiento acelerado, que impulsa nuevos avances tecnológicos, gracias a su estudio se están empezando a comprender los roles y la interacción del DNA, el RNA y las proteínas, así como las relaciones entre el medio ambiente, la herencia y la etiología de diversas enfermedades. Se prevé que en un futuro, el conocimiento de estos complejos mecanismos de regulación contribuirá a establecer nuevas vías terapéuticas que lleven a la optimización de estrategias terapéuticas. Un conocimiento más profundo de las modificaciones epigenéticas y mapas epigenéticos de cada tipo de enfermedad, permitirá diseñar mejores estrategias terapéuticas, siendo el reto el desarrollo de medicamentos específicos y sin la presencia o con mínimos efectos adversos.

## REFERENCIAS

- Adalsteinsson, B. y Ferguson-Smith, A., 2014 Epigenetic Control of the Genome-Lessons from Genomic Imprinting, *Genes*[en línea], 5 (3), 635-655. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257202>
- Arenas-Huertero, Francisco y Recillas-Targa, F. (2002) 'Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer', *Gaceta Médica de México*, 138 (6), 547-555.
- Bauer, J. y Bastian, B. C., 2006. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool, *Dermatologic Therapy* [en línea], 19 (1), pp. 40-49. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1529-8019.2005.00055.x>
- Bernstein, B. E., Meissner, A. y Lander, E. S. (2007a) The Mammalian Epigenome, *Cell* [en línea], 128 (4), 669-681. Disponible en: [https://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(07\)00128-6](https://www.cell.com/abstract/S0092-8674(07)00128-6)
- Chen, F. J., *et al.* (2013) Upregulation of the long non-coding rna hotair promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis, *Molecular Carcinogenesis* [en línea], 52 (11), 908-915. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mc.21944>

- Chuang, J. C. y Jones, P. A. (2007) Epigenetics and MicroRNAs, *Pediatric Research* [en línea], 61 (5 Part 2), 24R-29R. Disponible en: doi: 10.1002/mc.21944.
- Corella, D. y Ordovas, J. M., 2017. Conceptos básicos en biología molecular relacionados con la genética y la epigenética, *Revista Española de Cardiología* [en línea], 70 (9), 744-753. Disponible en: doi:10.1016/j.recesp.2017.02.034
- Cramer, S. A.; Adjei, I. M. y Labhasetwar, V. (2015) Advancements in the delivery of epigenetic drugs, *Expert Opinion on Drug Delivery* [en línea], 12 (9), 1501-1512. Disponible en: doi: 10.1517/17425247.2015.1021678
- Dawson, M. A. and Kouzarides, T. (2012) Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy, *Cell* [en línea], 150 (1), 12-27. Disponible en: doi:10.1016/j.cell.2012.06.013.
- Duenas-Gonzalez, A, et al., 2008. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors, *Cancer Treatment Reviews* [en línea], 34 (3), 206-222. Disponible en: doi: 10.1016/j.ctrv.2007.11.003.
- Franco Vera, L., 2009. Enfermedades epigenéticas: desde el cáncer hasta la sordera, *Cienc. Exact.Fís.Nat. (Esp)*.
- Gabory, A.; Attig, L. y Junien, C., 2011. Developmental programming and epigenetics, *The American Journal of Clinical Nutrition* [en línea], 94(suppl\_6), 1943S-1952S. Disponible en: doi: 10.3945/ajcn.110.000927.
- Goldberg, A. D.; Allis, C. D. y Bernstein, E., 2007a. Epigenetics: A Landscape Takes Shape, *Cell* [en línea], 128 (4), 635-638. Disponible en: doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006.
- Graça, I, et al., 2016. Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer, *Clinical Epigenetics* [en línea], 8 (1), p. 98. Disponible en: doi: 10.1186/s13148-016-0264-8.
- Handel, A. E.; Ebers, G. C. y Ramagopalan, S. V., 2010. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease, *Trends in Molecular Medicine* [en línea], 16 (1), 7-16. Disponible en: doi: 10.1016/j.molmed.2009.11.003.
- Hirst, M. and Marra, M. A., 2009. Epigenetics and human disease, *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology* [en línea], 41 (1), 136146. Disponible en: doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.011
- Horisawa, E. et al., 2002. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium, *Pharmaceutical research* [en línea], 19 (2), 132-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883639>.
- Johnson, C. et al., 2015. Epigenetics and cancer metabolism, *Cancer Letters* [en línea], 356 (2), 309-314. Disponible en: doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.043.

- Kadayifci, F. Z.; Zheng, S. y Pan, Y.-X., 2018. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation, *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], 19 (12), 4055. Disponible en:doi: 10.3390/ijms19124055.
- Kim, J. K.; Samaranayake, M. y Pradhan, S., 2009. Epigenetic mechanisms in mammals, *Cellular and Molecular Life Sciences* [en línea], 66 (4), pp. 596–612. Disponible en: doi: 10.1007/s00018-008-8432-4.
- Kronfol, M. M. *et al.*, 2017. The role of epigenomics in personalized medicine, *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* [en línea], 2 (1), 33-45. Disponible en; doi: 10.1080/23808993.2017.1284557.
- Kuroki, S. y Tachibana, M., 2018. Epigenetic regulation of mammalian sex determination, *Molecular and Cellular Endocrinology* [en línea], 468, 31-38. Disponible en: doi: 10.1016/j.mce.2017.12.006.
- De la Torre, M., 2017. Introducción a la epigenética, nuevo paradigma en nefrología, *Nefroplus* [en línea], 1-10. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-nefroplus-485-articulo-introduccion-epigenetica-nuevo-paradigma-nefrologia-X1888970017612260>
- Li, B.; Carey, M. y Workman, J. L., 2007<sup>a</sup>. The Role of Chromatin during Transcription, *Cell* [en línea], 128 (4), 707-719. Disponible en: doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015.
- Li, Y. y Tollefsbol, T. O., 2016. Age-related epigenetic drift and phenotypic plasticity loss: implications in prevention of age-related human diseases, *Epigenomics* [en línea], 8 (12), 1637-1651. Disponible en: doi: 10.2217/epi-2016-0078.
- Marks, D. L.; Olson, R. LO y Fernandez Zapico, M. E., 2016. Epigenetic control of the tumor microenvironment, *Epigenomics* [en línea], 8 (12), 1671-1687. Disponible en: doi: 10.2217/epi-2016-0110.
- Peedicayil, J., 2006. Epigenetic therapy-a new development in pharmacology, *The Indian journal of medical research* [en línea], 123 (1), 17-24. Disponible en: doi: 16567863.
- Sato, F. *et al.*, 2011a. MicroRNAs and epigenetics, *FEBS Journal* [en línea], 278 (10), 1598-1609. Disponible en: doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x.
- Sen, P. *et al.*, 2017. Loss of Snf5 Induces Formation of an Aberrant SWI/SNF Complex, *Cell Reports* [en línea], 18 (9), 2135-2147. Disponible en: doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.017.
- Sharma, S.; Kelly, T. K. y Jones, P. A., 2010. Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis* [en línea], 31 (1), 27-36. Disponible en: doi: 10.1093/carcin/bgp220.
- De Smedt, E. *et al.*, 2018. The Epigenome in Multiple Myeloma: Impact on Tumor Cell Plasticity and Drug Response, *Frontiers in Oncology* [en línea], 8. Disponible en: doi: 10.3389/fonc.2018.00566

- Toh, T. B., Lim, J. J. y Chow, E. K.-H., 2017. Epigenetics in cancer stem cells, *Molecular Cancer* [en línea], 16 (1), 29. Disponible en: doi: 10.1186/s12943-017-0596-9.
- Toyota, M. y Issa, J.-P. J., 2005a. Epigenetic Changes in Solid and Hematopoietic Tumors, *Seminars in Oncology* [en línea], 32 (5), 521-530. Disponible en: doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.07.003.
- Toyota, M. and Issa, J.-P. J., 2005b. Epigenetic Changes in Solid and Hematopoietic Tumors, *Seminars in Oncology* [en línea], 32 (5), 521-530. Disponible en: oi: 10.1053/j.seminoncol.2005.07.003.
- Yang, X. *et al*, 2010a. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy, *Trends in Pharmacological Sciences* [en línea], 31 (11), 536-546. Disponible en: doi: 10.1016/j.tips.2010.08.001.
- Yoder, J.A. and Bestor, T. H., 1998. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast, *Human molecular genetics* [en línea], 7 (2), 279-84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425235>.

# ECOFARMACOVIGILANCIA DE HIPOLIPEMIANTES (ESTATINAS Y FIBRATOS). EFECTOS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

*Edgar David González González*<sup>1\*</sup>

*Leobardo Manuel Gómez Oliván*<sup>1</sup>

*Marcela Galar Martínez*<sup>2</sup>

*Hariz Islas Flores*<sup>1</sup>

*María Dolores Hernández Navarro*<sup>1</sup>

Existe una creciente preocupación por el hallazgo de medicamentos en el ambiente acuático y la ecofarmacovigilancia es la disciplina que estudia dicha problemática, analizando la ocurrencia, destino y efectos para los seres humanos y para otros organismos en el ambiente. Los reductores de lípidos son uno de los grupos de medicamentos más comúnmente detectados en el medio acuático, donde se han detectado (en concentraciones del orden de  $\text{ng L}^{-1}$  o  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) como fármacos inalterados y metabolitos. A pesar de que la mayoría de los efectos agudos y crónicos que puedan tener en los ecosistemas son desconocidos, hay algunos efectos negativos comprobados. La presente revisión tiene como objetivo reunir los principales datos sobre el potencial ecotoxicológico de las estatinas y fibratos en organismos acuáticos.

## INTRODUCCIÓN

En un contexto de contaminación farmacéutica severa, la ecofarmacovigilancia (EFV) ha sido un área de interés novedosa. Su objetivo es garantizar que los problemas ambientales, significativos, asociados con los productos farmacéuticos en el medio ambiente se identifiquen de manera oportuna y se gestionen adecuadamente, convirtiéndose en un punto clave de investigación como ciencia integral y de límites

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* ed.gonzalezg@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto Nacional Politécnico

en el mundo, y los requisitos regulatorios que rigen la evaluación integral del riesgo ambiental de los productos farmacéuticos (Wang y Hu, 2014).

El término EFV fue acuñado por primera vez por Giampaolo Velo para indicar una disciplina emergente que se puede definir como “la ciencia y las actividades de detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos negativos relacionados con la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente” (Murray Smith, 2010). Esta definición se toma directamente de la definición de farmacovigilancia dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS): “la disciplina y el conjunto de actividades destinadas a identificar, evaluar y prevenir los efectos adversos u otros problemas relacionados con el uso de medicamentos” (World Health Organization, 2002).

Actualmente, la ecofarmacovigilancia se puede definir como la ciencia y actividades relacionadas con la detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos adversos u otros problemas relacionados con la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente, que afectan a humanos y a otras especies animales (Silva, Lino, Meisel, Barceló y Pena, 2012).

Debido al aumento de la producción y el consumo de medicamentos en todo el mundo, cada vez más productos farmacéuticos se liberan al sistema de alcantarillado por excreción (después del uso terapéutico humano y veterinario), descargas de fabricación, eliminación directa de medicamentos (no deseados o caducados), que finalmente ingresan en una variedad de matrices ambientales, incluidas aguas superficiales y subterráneas, sedimentos, suelos e incluso en agua potable (Daughton, 2016; Holm et al., 2013).

Los productos farmacéuticos más comúnmente detectados en el medio acuático incluyen antibióticos, fármacos antiinflamatorios, agentes hipolipemiantes y anticonvulsivos (Fent, Weston y Caminada, 2006); estos residuos farmacéuticos podrían causar efectos nocivos en los organismos ambientalmente expuestos.

Los reguladores de lípidos se informan con frecuencia en aguas residuales, superficiales y subterráneas, debido a su mayor uso en los últimos años (Andreozzi, Marotta y Paxéus, 2003; Gros, Petrović y Barceló, 2006; Lin y Reinhard, 2005; Sanderson, Johnson, Wilson, Brain y Solomon, 2003; Schmidt, O'Rourke, Hernan y Quinn, 2011; Togola y Budzinski, 2007).

## Fármacos hipolipemiantes

Los triglicéridos (TGC) y el colesterol son componentes esenciales del organismo. Entre, otras funciones, los TGC constituyen una forma de almacenamiento de energía, y el colesterol es necesario como unidad estructural de las membranas biológicas. Ambos lípidos son insolubles en agua y han de ser envasados para poder ser transportados en los medios acuosos de la linfa y la sangre. Para ello, pequeñas cantidades de lípidos son rodeados por una capa de fosfolípidos, en la cual también se depositan proteínas: las apolipoproteínas (A). Según la cantidad y proporción de lípidos almacenados, y la naturaleza de las A, pueden distinguirse: quilomicrones y partículas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL).

En el metabolismo de las lipoproteínas, las células del epitelio intestinal traspasan los lípidos absorbidos principalmente a la linfa en forma de quilomicrones ricos en triglicéridos. Éstos llegan al torrente circulatorio sin pasar por el hígado, y así aportan los ácidos grasos a los diferentes tejidos, bajo la acción de la lipoproteinlipasa presente en el endotelio. Las partículas restantes llegan a la célula hepática, a la que proveen el colesterol procedente de la dieta.

El hígado cubre sus necesidades de colesterol en su mayor parte (60%) mediante la síntesis *de novo* a partir de la acetil-coenzima-A. Su velocidad está regulada por la actividad de una reductasa, la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa: paso de conversión de la HMG-CoA en ácido mevalónico. El hígado necesita colesterol para la síntesis de partículas VLDL y ácidos biliares. Las partículas VLDL ricas en TGC se vierten al torrente sanguíneo y proveen a otros tejidos de ácidos grasos, en forma similar a los quilomicrones. Quedan como residuo las partículas LDL residuales, que o bien retornan al hígado o sirven como suministro de colesterol para tejidos extrahepáticos.

Las partículas LDL portan la apolipoproteína B100, mediante la cual se unen a los receptores que intervienen en la introducción de LDL en la célula, incluidos los hepatocitos (endocitosis mediada por receptores). Las partículas HDL tienen la capacidad de recoger colesterol de las células y transferirlo a las partículas LDL. De esta forma el colesterol es transportado desde los tejidos hacia el hígado (Lüllmann et al, 2010).

Para descender los niveles lipídicos existen diversos fármacos, pertenecientes a seis grupos de medicamentos (Canalizo et al., 2013), con mecanismos de acción y efectos distintos sobre las LDL (colesterol) y VLDL (triglicéridos):

- a) Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas).
- b) Inhibidores de la absorción del colesterol (ezetimiba).
- c) Secuestradores de ácidos biliares.
- d) Derivados del ácido nicotínico.
- e) Derivados del ácido fibríco (fibratos, como bezafibrato y gemfibrozilo).
- f) Ácidos grasos omega-3.

Los fibratos y las estatinas son los principales medicamentos hipolipemiantes que se prescriben solos o en terapia de combinación para disminuir los niveles de colesterol en plasma y reducir la incidencia de enfermedad coronaria. Aunque parcialmente desplazado por las estatinas, el número total de prescripciones de fibratos está en constante aumento (Holoshitz et al., 2008). Estos últimos han sido analizados con mayor frecuencia en el medio acuático que los primeros. Ambos tipos se usan para disminuir la concentración de colesterol (estatinas y fibratos) y triglicéridos (fibratos) en el plasma sanguíneo.

Los fármacos hipocolesterolémicos, también conocidos como estatinas, se han detectado en aguas superficiales en concentraciones que varían entre  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Gracia Lor et al., 2011; Grung et al., 2007; Langford y Thomas, 2011; Metcalfe et al., 2003), aunque los datos sobre las concentraciones ambientales de simvastatina son aún escasos.

Las estatinas, como inhibidores de la síntesis de colesterol, actúan inhibiendo la HMG-CoA reductasa, responsable del paso limitante en la síntesis del colesterol, concretamente la conversión de HMG-CoA en mevalonato (Laufs y Liao, 1998). Las estatinas compiten con HMG-CoA por el sitio activo de la enzima, alterando su conformación e inhibiendo su función, disminuyendo así la síntesis de colesterol (Blumenthal, 2000). Como consecuencia del agotamiento del colesterol intracelular, la expresión de los receptores de LDL en las membranas de los hepatocitos aumenta y, por lo tanto, la resorción del colesterol LDL del plasma sanguíneo.

La mayoría de las estatinas se administran en la forma de ácido biológicamente activo, a excepción de simvastatina y lovastatina que se administran como el profármaco lactona (Fujino, Saito, Tsunenari, Kojima y Sakaeda, 2004). *In vivo*, las formas de ácido y lactona se interconvierten en plasma hasta que se alcanza el equilibrio (KeRNAey, Crawford, Mehta y Radebaugh, 1993). El profármaco lactona generalmente tiene una mayor toxicidad que la forma ácida biológicamente activa de las estatinas, presumiblemente debido a su mayor potencial de difusión pasiva a

través de las membranas celulares (Skottheim, Gedde-Dahl, Hejazifar, Hoel y Åsberg, 2008). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo completo de la toxicidad por estatinas (Evans y Rees, 2002).

Por el contrario, los efectos de los fibratos están mediados, al menos en parte, a través de alteraciones en la transcripción de genes que codifican proteínas que controlan el metabolismo de las lipoproteínas. Los fibratos actúan probablemente activando la enzima lipoproteína lipasa, que es principalmente responsable de la conversión de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a lipoproteínas de alta densidad (HDL), disminuyendo así la concentración plasmática de triglicéridos. La unión de fibratos a receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR), receptores nucleares que se sabe que se activan durante diferentes rutas celulares, estimula la expresión de varias proteínas reguladoras de lípidos tales como, la lipoproteína lipasa (Staels et al, 1998).

Los fibratos son una clase de medicamentos derivados del ácido fibríco ampliamente utilizados para reducir los triglicéridos plasmáticos y elevar el nivel de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). Sus formas activas, los ácidos fibrícos, ejercen sus efectos biológicos uniéndose al receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR $\alpha$ ), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando. Se ha afirmado que la mayoría de los fibratos se excretan sin modificar (Isidori, Nardelli, Pascarella, Rubino y Parrella, 2007).

El ácido clofibríco es un metabolito activo del clofibrato, el ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanoico, y un fármaco persistente utilizado como regulador lipídico que se ha detectado en aguas superficiales, incluso años después de que dejara de utilizarse (Buser, Müller y Theobald, 1998). Los primeros resultados relativos a la presencia ambiental de ácido clofibríco fueron informados por (Garrison, Pope y Allen, 1976). Estos autores detectaron el compuesto a bajos niveles de concentración (ng L<sup>-1</sup>) en aguas residuales tratadas. Posteriormente, se reportó la presencia de ácido clofibríco en otros estudios en concentraciones de 0.049-0.066 mg L<sup>-1</sup> en aguas superficiales (Ternes, 1998; Tixier, Singer, Oellers y Müller, 2003) y de hasta 270 ng L<sup>-1</sup> en agua potable (Heberer y Stan, 1997). La presencia de este fármaco en PTAR ha sido reportada repetidamente después de su detección en el efluente de una planta de tratamiento alemana (Andreozzi et al., 2003; Tauxe-Wuersch et al., 2005; Ternes, 1998).

El bezafibrato, ácido 2-[4-[2-[(4-clorobenzoil)amino]etil]fenoxi]-2-metil-propanoico, es un fármaco ampliamente utilizado como regulador lipídico, cuyo consumo ha aumentado considerablemente durante los últimos años (Lambropoulou *et al.*, 2008). Debido a su gran uso y su persistencia, se ha detectado bezafibrato en aguas superficiales y potables, así como en efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales (PTAR) en el rango de  $\text{ng L}^{-1}$  (Fent *et al.*, 2006; Metcalfe, Koenig *et al.*, 2003; Metcalfe Miao, *et al.*, 2003).

El gemfibrozilo, ácido 5-(2, 5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoico, es también un agente regulador de lípidos que se usa cada vez más, clasificado genéricamente como un derivado del ácido fíbrico (Sanderson *et al.*, 2003) se encontraron niveles alrededor de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  en efluentes de PTAR. (Metcalfe, Koenig, *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2003) Detectaron valores similares ( $0.75\text{-}1.50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para las concentraciones más altas de gemfibrozilo en aguas superficiales.

Como un tipo de compuestos biológicamente activos diseñados para ser efectivos en bajas concentraciones, los productos farmacéuticos en el ambiente natural podrían tener posibles impactos adversos para una variedad de organismos no específicos debido a exposiciones a largo plazo, incluyendo toxicidad crónica, resistencia a antibióticos, disrupción endocrina, los efectos tóxicos en la reproducción de organismos terrestres y acuáticos, incluso se convierten en un problema creciente de salud pública (Gao *et al.*, 2012; Nödler *et al.*, 2014).

### Efecto de hipolipemiantes en organismos acuáticos

La presencia de estos productos farmacéuticos en ambientes acuáticos genera preocupación con respecto a sus efectos sobre las especies no objetivo. Esto es especialmente relevante para los teleósteos, donde la hipercolesterolemia es una condición normal (Larsson y Fänge, 1977). Los peces y los salmónidos en particular son susceptibles a las lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias, que se atribuyen no a la hipercolesterolemia en sí, sino a la tasa de crecimiento y la madurez sexual (Saunders *et al.*, 1992). En general, la concentración plasmática de colesterol en la mayoría de las especies de peces es 2-6 veces mayor que la de los mamíferos (Babin y Vernier, 1989; Larsson y Fänge, 1977).

Los datos sobre esta clase de compuestos son escasos. Los fibratos se han evaluado mediante pruebas de toxicidad tradicionales. Se encontraron los siguientes NOEC para el ácido clofibrico en la pulga de agua *Ceriodaphnia dubia* [NOEC (7 días) = 640  $\mu\text{g L}^{-1}$ ], el rotífero planctónico *Brachionus calyciflorus* [NOEC (2 días) = 246  $\mu\text{g L}^{-1}$ ], y en etapas tempranas de la vida del pez cebra *Danio rerio* [NOEC (10 días) = 70  $\text{mg L}^{-1}$ ] (Ferrari et al., 2003). El gemfibrozilo se encontró en el plasma sanguíneo del pez dorado (*Carassius auratus*), después de la exposición durante 14 días a niveles 113 veces mayores que en el agua (factor de bioconcentración de 113). La testosterona plasmática se redujo en más del 50% después de la exposición a 1.5 y 10  $\text{mg L}^{-1}$ , así como los niveles de transcripción de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) en testículos del pez dorado (Mimeault et al., 2005).

Bioensayos y estudios ecotoxicológicos sobre los efectos del bezafibrato (BEZ) con el pez *Pimephales promelas*, la cianobacteria *Anabaena* o el hidroide *Hydra* atenúan el efecto revelado de las concentraciones en el rango de  $\text{mg L}^{-1}$ , que es mucho más alto que el encontrado en el ambiente (Quinn et al, 2004; Rosal et al, 2010; Weston et al, 2009).

Además, en el bivalvo *Mytilus galloprovincialis*, concentraciones muy bajas de BEZ provocaron alteraciones en la glucólisis, el equilibrio redox y la función peroxisomal de la glándula digestiva (Canesi et al., 2007), evidenciando así que las concentraciones ambientales de BEZ pueden modificar las funciones celulares fundamentales, por lo tanto, crea condiciones adversas para organismos no objetivo.

Isidori y su equipo (2007) evaluaron la ecotoxicidad de los fibratos. Se investigaron los siguientes compuestos: bezafibrato, fenofibrato y gemfibrozilo. Se realizaron bioensayos sobre *Vibrio fischeri*, *Brachionus calyciflorus*, *Ceriodaphnia dubia*, *Thamnocephalus platyurus* y *Daphnia magna* para evaluar la toxicidad aguda y crónica. Los resultados mostraron que la toxicidad aguda estaba en el orden de docenas de  $\text{mg L}^{-1}$  para todos los niveles tróficos utilizados en los bioensayos (bacterias, rotíferos y microcrustáceos). La exposición crónica a estos compuestos causó la inhibición de la población de crecimiento en rotíferos y crustáceos, mientras que las algas parecían estar ligeramente afectadas por esta clase de productos farmacéuticos.

El bezafibrato (BEZ), la carbamazepina (CBZ) y el ibuprofeno (IBU) se probaron para determinar su potencial de bioacumulación y provocar cambios moleculares en el organismo no diana, *Dreissena polymorpha*. Cambios en el RNAm de enzimas y otras proteínas implicadas en la prevención del daño proteico (proteína de choque térmico

70, hsp70) y estrés oxidativo (superóxido dismutasa y catalasa), biotransformación (glutación S-transferasa clase pi, piGST), eliminación y modificación postraduccional de la proteína reversible (fosfatasa 2A) sirvieron como biomarcadores moleculares. Los mejillones se expusieron en un sistema de flujo continuo a concentraciones crecientes de los tres fármacos (1, 10, 100 y 1000 nM); las concentraciones más bajas corresponden a aquellas ambientalmente relevantes detectadas en aguas superficiales y efluentes, respectivamente. El estudio demostró claramente que CBZ e IBU pueden acumularse en los mejillones, especialmente a bajas concentraciones en tan sólo unos pocos días. Además, la exposición a una concentración de BEZ ambientalmente relevante provocó un aumento inmediato en el nivel de transcrito mejorado de la glándula piGST en la glándula digestiva, seguido de una regulación ascendente de la hsp70 después de cuatro y siete días que evidencia una condición de estrés crónico para los mejillones. Los cambios moleculares debidos a la exposición a CBZ, IBU y BEZ fueron detectables a las concentraciones de exposición que se encuentran en las aguas superficiales (Contardo Jara et al., 2011).

La toxicidad puede evaluarse a partir de los valores de la  $CE_{50}$ , según las categorías establecidas en la orientación técnica sobre evaluación de riesgos de sustancias en la Unión Europea (European Commission, 2003). En ella, las muestras de aguas residuales o compuestos estándar se consideran “dañinos para los organismos acuáticos” si la  $CE_{50}$  cae en el rango de 10-100 mg L<sup>-1</sup>, “tóxico” si la  $1 < CE_{50} < 10$  mg L<sup>-1</sup> y “muy tóxico” si la  $CE_{50} < 1$  mg L<sup>-1</sup>.

Rosal e investigadores (2010) realizaron un estudio para evaluar la toxicidad aguda del bezafibrato, ácido clofibrico, gemfibrozilo y ácido fenofibrico, un metabolito del fenofibrato cuya ecotoxicidad no se ha informado previamente, en organismos acuáticos (*Anabaena*, *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri*). La mayor toxicidad correspondió al ácido fenofibrico, con una  $CE_{50}$  tan baja como 1.72 mg L<sup>-1</sup> para *V. fischeri*. El gemfibrozilo también fue tóxico para *Anabaena* con una  $CE_{50}$  de 4.42 mg L<sup>-1</sup>. El estudio informa los resultados de las pruebas de toxicidad utilizando muestras fortificadas de aguas residuales reales tomadas del efluente de una PTAR. El agua residual en sí misma resultó ser muy tóxica para *Anabaena* (84% de la inhibición de la bioluminiscencia), mientras que no tuvo ningún efecto negativo sobre *D. magna* o *V. fischeri*. Por el contrario, la luminiscencia de *V. fischeri* exhibió un efecto estimulante en las aguas residuales. El bioensayo con *Anabaena* reveló un cierto riesgo asociado con los tres compuestos menos tóxicos probados. En base a los bioensayos

con *V. fischeri* y *D. magna*, el bezafibrato y el gemfibrozilo se habrían considerado no tóxicos y nocivos, respectivamente. El uso de datos de las  $CE_{50}$  medidos en aguas residuales aumenta la estimación del riesgo.

Los estudios disponibles con gemfibrozilo (GEM) han demostrado su capacidad para afectar el comportamiento de alimentación del cnidario *Hydra attenuata* (Quinn, Gagné y Blaise, 2008) y el crecimiento del alga *Chlorella vulgaris* (Zurita et al., 2007), así como para activar las enzimas antioxidantes e interferir con la expresión de la metalotioneína. En el mejillón azul (*Mytilus edulis*) (Schmidt et al., 2011) y el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) (Quinn et al., 2011). Se mostró que la exposición a GEM afecta el desarrollo y la actividad locomotora de las larvas del pez cebra (*Danio rerio*) (Henriques et al., 2016).

La toxicidad del gemfibrozilo (GEM) se ha evaluado en algunos estudios. La exposición (durante 5-28 días) a GEM (en concentraciones de  $0.38 \mu\text{g L}^{-1}$ - $15 \text{mg L}^{-1}$ ) indujo el síndrome de malabsorción embrionaria en larvas del pez cebra, *Danio rerio* (Raldúa et al., 2008) y causó daño genotóxico en peces cebra adultos (Rocco et al., 2010). Además, la exposición (durante 2-21 días) a GEM (en concentraciones de  $1.5$ - $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) redujo los niveles plasmáticos de colesterol, alteró la abundancia de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y redujo la fecundidad, pero no pareció afectar los niveles plasmáticos de triglicéridos o esteroides sexuales en la carpa cabeza (*Pimephales promelas*) (Skolness et al., 2012).

Del mismo modo, el gemfibrozilo causó efectos tanto moleculares como citogenéticos en los eritrocitos de *Sparus aurata* después de 96 horas de exposición. Los hallazgos del presente estudio son ecológicamente relevantes ya que el gemfibrozilo fue capaz de inducir efectos genotóxicos en concentraciones observadas en el medio ambiente ( $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Barreto et al, 2017).

Pocos estudios han investigado el efecto de las estatinas en organismos no objetivo. Se observó la inhibición del crecimiento en la lenteja de agua *Lemna gibba* (Brain et al, 2006) y la formación anormal del intestino en larvas de rana, después de la exposición a atorvastatina y lovastatina (Richards y Cole, 2006).

Ellesat y equipo (2010), realizaron la cuantificación de los efectos citotóxicos de las formas de ácido y lactona de dos estatinas, atorvastatina y simvastatina, así como de sus metabolitos en los hepatocitos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los hepatocitos se expusieron durante 24, 48 y 72 horas a diferentes concentraciones de cada sustancia de prueba ( $0.4$ - $400 \mu\text{M}$ ). La citotoxicidad se midió como la inhibición

metabólica y la pérdida de la integridad de la membrana. Los resultados mostraron que la atorvastatina y simvastatina tuvieron efectos citotóxicos dependientes de la dosis en los hepatocitos. Concluyendo que la simvastatina es más tóxica que la atorvastatina y la lactona es más tóxica que la forma ácida.

En vertebrados, las estatinas disminuyen la síntesis de colesterol a través de la inhibición competitiva de la enzima HMG-CoA reductasa, responsable del paso limitante en la vía del mevalonato (Burg y Espenshade, 2011; Fent et al., 2006). Curiosamente, mientras que los vertebrados obtienen colesterol de la vía del mevalonato, el colesterol no se sintetiza *de novo* en los artrópodos (Li et al., 2003). Los crustáceos, por ejemplo, sintetizan el fRNAesoato de metilo (MF) en la ruta biosintética del mevalonato, que comparte la mayoría de los pasos enzimáticos con los vertebrados (Bellés et al., 2005; Neuparth et al., 2014). Por lo tanto, aunque se dirige a la misma enzima tanto en vertebrados como en artrópodos, es probable que el resultado esperado de la inhibición de HMG-CoA reductasa difiera debido a las diferentes vías descendentes (Neuparth et al., 2014).

Dado el papel central del MF en la reproducción de crustáceos, recientemente (Neuparth et al., 2014) evaluaron los efectos (supervivencia, crecimiento y reproducción, con biomarcadores histopatológicos en hepatopáncreas y gónadas) causados por la exposición crónica a simvastatina ( $64 \text{ ng L}^{-1}$  a  $8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) en el anfípodo *Gammarus locusta*. Los hallazgos mostraron que la exposición crónica a simvastatina afectó severamente el crecimiento, la reproducción y la maduración de las gónadas de *G. locusta*, concomitante a cambios a nivel histológico.

La toxicidad aguda de SIM ha sido demostrada previamente para algunos crustáceos, como el copépodo harpacticoide *Nitocra spinipes* ( $CL_{50} = 810 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) y la larva de camarón fantasma (*Palaemonetes pugio*) ( $CL_{50} = 1180 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Dahl et al., 2006; Key et al., 2008).

Se informan varios efectos tóxicos de atorvastatina (ATV) especialmente en embriones del pez cebra. La exposición (durante 24 horas) a ATV (en concentraciones  $-6 \text{ mg L}^{-1}$ ) bloqueó la migración de células germinales primordiales (Thorpe et al., 2004). Además, la exposición (durante 48 horas) a ATV (en concentraciones de  $0.03\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$ ) afectó la estabilidad de los vasos sanguíneos e indujo accidente cerebrovascular hemorrágico (Eisa Beygi et al., 2013; Gjini et al., 2011). Las exposiciones hídricas (durante 5-14 días) a ATV (en concentraciones de  $0.2\text{-}10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) también indujeron daño genotóxico en el pez cebra adulto (Rocco et al.,

2010) y regularon positivamente la abundancia de genes implicados en el transporte de membrana, respuesta al estrés oxidativo y biotransformación en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ellesat et al., 2012).

En un estudio realizado por (Al-Habsi et al., 2016) se examinaron los efectos del GEM y la ATV en peces cebrá (hembras y machos) después de una exposición dietética de 30 días. La exposición provocó cambios en varios parámetros bioquímicos (reducción de colesterol, triglicéridos, cortisol, testosterona y estradiol). Los cambios en la concentración de colesterol y triglicéridos se asociaron con alteraciones en los niveles de transcripción de genes clave relacionados con el colesterol y la regulación de lípidos. Este estudio respalda que estos medicamentos afectan el metabolismo del colesterol y la producción de esteroides en el pez cebrá adulto, concluyendo que la reducción de cortisol puede perjudicar la capacidad de estos peces para generar una respuesta de estrés adecuada, mientras que la reducción de esteroides sexuales puede afectar negativamente la reproducción.

Saravanan y equipo (2014) investigaron la toxicidad del ácido clofibríco (CA) y diclofenaco (DCF) en la carpa mayor india, *Cirrhinus mrigala*. Los alevines de *C. mrigala* se expusieron a diferentes concentraciones (1, 10 y 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de CA y DCF durante un período de 96 h (corto plazo) y 35 días (largo plazo). Se evaluaron los efectos tóxicos de los fármacos sobre la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). Durante el período de exposición a corto y largo plazo, se encontró que el nivel de TSH disminuía en todas las concentraciones de CA en comparación con los grupos de control. Se encontró que el nivel de T4 disminuía a 1 y 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de exposición a CA al final de 96 h. Sin embargo, el nivel de T4 disminuyó en todas las concentraciones de CA y DCF durante el período de exposición a largo plazo (35 días). Los peces expuestos a todas las concentraciones de CA y DCF tuvieron un menor nivel de T3 en ambos tratamientos. Estos resultados sugieren que los fármacos CA y DCF indujeron cambios significativos en los niveles hormonales tiroideos de *C. mrigala*.

Estudios previos demuestran los efectos del ácido clofibríco sobre los niveles de colesterol, el precursor de todas las hormonas esteroideas sexuales. De hecho, la exposición de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), la carpa cabezona (*Pimephales promelas*) y el pez cebrá (*Danio rerio*) a fibratos redujo los niveles de colesterol en plasma y, en consecuencia, indujo efectos hipocolesterolémicos (Du et al., 2008; Owen et al., 2010; Velasco Santamaría et al., 2011).

Un estudio realizado por (Coimbra et al., 2015) mostró que la exposición crónica del pez cebra (*D. rerio*) al ácido clofíbrico (en concentraciones de 1 y 10 mg/g) afecta la acumulación de triglicéridos en el músculo y el crecimiento de los peces, e impacta la fecundidad, el desarrollo de las gónadas, la proporción de sexos y el desarrollo de los embriones. Todos estos efectos se producen de forma concomitante con los cambios en los niveles de transcripción de genes clave implicados en la homeostasis lipídica, tanto en los peces expuestos como en su progenie, lo que sugiere el desencadenamiento de mecanismos epigenéticos, que da más apoyo a una interrupción multigeneracional de las vías de señalización de lípidos.

Las interacciones toxicológicas entre hipolipemiantes han sido ensayadas, (Rodea Palomares et al., 2010) estudiaron la interacción toxicológica de los reguladores de lípidos (gemfibrozilo, bezafibrato y ácido fenofíbrico), usando el índice de combinación-isoblograma. Este estudio se realizó utilizando dos microorganismos bioluminiscentes acuáticos, la bacteria marina *Vibrio fischeri* y una cianobacteria del género *Anabaena*. Para la bacteria marina, la interacción predominante fue antagonista a bajos niveles de efecto (*fa*), cambiando a sinergismo a niveles de efecto más altos. *Anabaena* mostró efectos de sinergia y antagonismo, el primero predominó a niveles de efecto por debajo de 0.4-0.5 y el segundo por valores más altos. Para la cianobacteria, las mezclas ternarias fueron generalmente más sinérgicamente tóxicas que sus binarias correspondientes.

## CONCLUSIÓN

La ecofarmacovigilancia, como un tipo de vigilancia para el medio ambiente, tiene como objetivo práctico, minimizar los riesgos potenciales que plantea la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente. Sin embargo, en vista de la diversidad de productos farmacéuticos (en propiedades químicas, estructurales, biológicas o toxicológicas), y considerando que estos contaminantes se encuentran como mezclas en el ambiente real, resulta complicado llevar a cabo un proceso de ecofarmacovigilancia riguroso y unitario para todos los productos farmacéuticos. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios que incluyan los posibles efectos combinados derivados de las mezclas de productos farmacéuticos.

Se ha reportado la presencia de fármacos hipolipemiantes (principalmente fibratos y estatinas), a niveles de  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\text{mg L}^{-1}$ , en aguas residuales, superficiales y subterráneas y, en menor medida, en agua potable. Así mismo, se reportan efectos tóxicos (principalmente alteraciones en el crecimiento y la reproducción) de los reguladores de lípidos en organismos acuáticos como: cianobacterias, algas, rotíferos, crustáceos, plantas acuáticas, bivalvos y peces. Estos efectos se derivan de los mecanismos de acción, los fibratos activan los receptores activados por el PPAR, principalmente PPAR $\alpha$ . La activación de PPAR $\alpha$  altera la expresión de los genes que regulan el metabolismo de los lípidos, mientras que las estatinas inhiben específicamente la HMG-CoA reductasa, una enzima que convierte la HMG-CoA en mevalonato, un precursor del colesterol. Las estatinas compiten con HMG-CoA por el sitio activo de la enzima, alterando su conformación e inhibiendo su función.

## REFERENCIAS

- Al-Habsi, A. A.; Massarsky, A. y Moon, T. W., 2016. Exposure to gemfibrozil and atorvastatin affects cholesterol metabolism and steroid production in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part-B: Biochemistry and Molecular Biology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.009>
- Andreozzi, R.; Marotta, R.; y Paxéus, N., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* [on line]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00769-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00769-5)
- Babin, P. J. y Vernier, J., 1989. No Title. *Journal of Lipid Research*, 30 (4), 467-489.
- Barreto, A.; Luis, L. G.; Soares, A. M. V. M.; Paíga, P.; Santos, L. H. M. L. M.; Delerue Matos, C.; ... Oliveira, M., 2017. Genotoxicity of gemfibrozil in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.05.011>
- Bellés, X.; Martín, D. y Piulachs, M. D., 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology* [en línea], 50 (1), 181-199. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>
- Blumenthal, R. S., 2000. Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. *American Heart Journal* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(00\)90033-4](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(00)90033-4)

- Brain, R. A.; Reitsma, T. S.; Lissemore, L. I.; Bestari, K.; Sibley, P. K. y Solomon, K. R., 2006. Herbicidal effects of statin pharmaceuticals in *Lemna gibba*. *Environmental Science and Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es0600274>
- Burg, J. S. y Espenshade, P. J., 2011. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progress in Lipid Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.07.002>
- Buser, H. R.; Müller, M. D. y Theobald, N., 1998. Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environmental Science and Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es9705811>
- Canalizo, E.; Favela, E.; Salas, J.; Gómez, R.; Jara, R.; Torres, L. y Viniegra, A., 2013. Guía de práctica clínica: Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Revista Médica Mexicana Del Seguro Social*.
- Canesi, L.; Lorusso, L. C.; Ciacci, C.; Betti, M.; Regoli, F.; Poiana, G.; ... Marcomini, A., 2007. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.085>
- Coimbra, A. M., Peixoto, M. J., Coelho, I., Lacerda, R., Carvalho, A. P., Gesto, M., ... Santos, M. M. (2015). Chronic effects of clofibric acid in zebrafish (*Danio rerio*): A multigenerational study. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.013>
- Contardo Jara, V.; Lorenz, C.; Pflugmacher, S.; Nützmann, G.; Kloas, W. y Wiegand, C., 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>
- Daughton, C. G. (2016). Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Science of the Total Environment* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.109>
- Du, Z. Y.; Clouet, P.; Degrace, P.; Zheng, W. H.; Frøyland, L.; Tian, L. X. y Liu, Y. J., 2008. Hypolipidaemic effects of fenofibrate and fasting in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0007114508986840>

- Eisa-Beygi, S.; Hatch, G.; Noble, S.; Ekker, M. y Moon, T. W. (2013). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) pathway regulates developmental cerebral-vascular stability via prenylation-dependent signalling pathway. *Developmental Biology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.024>
- Ellesat, K. S.; Holth, T. F.; Wojewodzic, M. W. y Hylland, K., 2012. Atorvastatin up-regulate toxicologically relevant genes in rainbow trout gills. *Ecotoxicology* [on line]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0918-z>
- Ellesat, K. S.; Tollefsen, K. E.; Åsberg, A.; Thomas, K. V. y Hylland, K., 2010. Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicology in Vitro* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.006>
- European Commission., 2003. *Technical guidance document on risk assessment. European Chemicals Bureau.*
- Evans, M. y Rees, A., 2002. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: Are all statins the same? *Drug Safety* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.2165/00002018-200225090-00004>
- Fent, K.; Weston, A. A. y Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferrari, B.; Paxéus, N.; Giudice, R. Lo; Pollio, A. y Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9)
- Fujino, H.; Saito, T.; Tsunenari, Y.; Kojima, J. y Sakaeda, T., 2004. Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00498250400015319>
- Gao, P.; Ding, Y.; Li, H. y Xagorarakis, I., 2012. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.017>
- Garrison, A. W.; Pope, J. D. y Allen, F. R., 1976. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water.*
- Gjini, E.; Hekking, L. H.; Kuchler, A.; Saharinen, P.; Wienholds, E.; Post, J. A.; ... Schulte-Merker, S., 2011. Zebrafish Tie-2 shares a redundant role with Tie-1 in heart development and regulates vessel integrity. *Disease Models y Mechanisms* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1242/dmm.005033>

- Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V. y Hernández, F., 2011. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.026>
- Gros, M.; Petrovi, M. y Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>
- Grung, M.; Heimstad, E.; Moe, M.; Schlabach, M.; Svenson, A.; Thomas, K. y Woldegiorgis, A., 2007. *Human and veterinary pharmaceuticals, narcotics, and personal care products in the environment. Swedish Environmental Research Institute* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1139/m88-128>
- Heberer, T. y Stan, H. J., 1997. Determination of Clofibrilic Acid and N-(Phenylsulfonyl)-Sarcosine in Sewage, River and Drinking Water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/03067319708031398>
- Henriques, J. F., Almeida, A. R., Andrade, T., Koba, O., Golovko, O., Soares, A. M. V. M., ... Domingues, I., 2016. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017>
- Holm, G.; Snape, J. R.; Murray Smith, R.; Talbot, J.; Taylor, D. y Sörme, P., 2013. Implementing ecopharmacovigilance in practice: Challenges and potential opportunities. *Drug Safety* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40264-013-0049-3>
- Holoshitz, N.; Alsheikh-Ali, A. A. y Karas, R. H., 2008. Relative Safety of Gemfibrozil and Fenofibrate in the Absence of Concomitant Cerivastatin Use. *American Journal of Cardiology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.07.057>
- Isidori, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L.; Rubino, M. y Parrella, A., 2007. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environment International* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.01.006>
- KeRNAey, A. S., Crawford, L. F., Mehta, S. C., y Radebaugh, G. W. (1993). The Interconversion Kinetics, Equilibrium, and Solubilities of the Lactone and Hydroxyacid Forms of the HMG-CoA Reductase Inhibitor, CI-981. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* [on line]. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1018923325359>

- Lambropoulou, D. A.; Hernando, M. D.; Konstantinou, I. K.; Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Albanis, T. A. y Fernández Alba, A. R., 2008. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO<sub>2</sub> aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.030>
- Langford, K. y Thomas, K. V., 2011. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/c0em00342e>
- Larsson, Å. y Fänge, R., 1977. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry And* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90142-0)
- Laufs, U. y Liao, J. K., 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of Biological Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24266>
- Li, S.; Wagner, C. A.; Friesen, J. A. y Borst, D. W., 2003. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the lobster mandibular organ: Regulation by the eyestalk. *General and Comparative Endocrinology* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00246-6)
- Lin, A. Y. C. y Reinhard, M., 2005. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/04-236R.1>
- Lüllmann, H.; Mohr, K. y Hein, L., 2010. *Farmacología: texto y atlas. Médica Panamericana*.
- Metcalf, C. D.; Koenig, B. G.; Bennie, D. T.; Servos, M.; Ternes, T. A. y Hirsch, R., 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/02-469>
- Metcalf, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G. y Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Mimeault, C.; Woodhouse, A. J.; Miao, X. S.; Metcalf, C. D.; Moon, T. W. y Trudeau, V. L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.009>

- Murray Smith, R., 2010. Ecopharmacovigilance: a drug company perspective. April 4, 2013. Disponible en: [http://isop2010.isoponline.org/uploads/prog/Programme\\_-3rd\\_-\\_7th\\_November-.pdf](http://isop2010.isoponline.org/uploads/prog/Programme_-3rd_-_7th_November-.pdf)
- Neuparth, T.; Martins, C.; Santos, C. B. D. los; Costa, M. H.; Martins, I.; Costa, P. M. y Santos, M. M., 2014. Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.009>
- Nödler, K., Voutsas, D., y Licha, T., 2014. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Marine Pollution Bulletin* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.024>
- Owen, S. F., Huggett, D. B., Hutchinson, T. H., Hetheridge, M. J., McCormack, P., Kinter, L. B., ... Sumpter, J. P., 2010. The value of repeating studies and multiple controls: Replicated 28-day growth studies of rainbow trout exposed to clofibrac acid. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/etc.351>
- Quinn, B., Gagné, F., y Blaise, C., 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.038>
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., y Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.007>
- Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., y Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.033>
- Raldúa, D., André, M., y Babin, P. J., 2008. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.11.016>
- Richards, S. M., y Cole, S. E., 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0102-4>

- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., y Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.032>
- Rodea Palomares, I., Petre, A. L., Boltes, K., Leganés, F., Perdígón-Melón, J. A., Rosal, R., y Fernández-Piñas, F., 2010. Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *Water Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.026>
- Rosal, R., Rodea Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Gonzalo, S., y Petre, A., 2010. Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0137-1>
- Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C. J., Brain, R. A., y Solomon, K. R., 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00257-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00257-1)
- Saravanan, M., Hur, J. H., Arul, N., y Ramesh, M., 2014. Toxicological effects of clofibrac acid and diclofenac on plasma thyroid hormones of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* during short and long-term exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.013>
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., y Quinn, B., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.043>
- Silva, L. J. G., Lino, C. M., Meisel, L., Barceló, D., y Pena, A., 2012. *Ecopharmacovigilance. Handbook of Environmental Chemistry* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/698\\_2011\\_128](https://doi.org/10.1007/698_2011_128)
- Skolness, S. Y., Durhan, E. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Villeneuve, D. L., y Ankley, G. T., 2012. Effects of gemfibrozil on lipid metabolism, steroidogenesis, and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/etc.1989>

- Skottheim, I. B., Gedde-Dahl, A., Hejazifar, S., Hoel, K., y Åsberg, A., 2008. Statin induced myotoxicity: The lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.12.009>
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., y Fruchart, J. C., 1998. Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.19.2088>
- Tauxe Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., y Tarradellas, J., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.003>
- Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
- Thorpe, J. L., Doitsidou, M., Ho, S. Y., Raz, E. y Farber, S. A., 2004. Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGC<sub>o</sub>A reductase activity and prenylation. *Developmental Cell* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00032-2)
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S. y Müller, S. R., 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es025834r>
- Togola, A. y Budzinski, H., 2007. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1251-x>
- Velasco-Santamaría, Y. M., Korsgaard, B., Madsen, S. S. y Bjerregaard, P., 2011. Bezafibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.018>
- Wang, J. y Hu, X., 2014. Ecofarmacovigilance: Current state, challenges, and opportunities in China. *Indian Journal of Pharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.125158>
- Weston, A., Caminada, D., Galicia, H. y Fent, K., 2009. Effects of lipid-lowering pharmaceuticals bezafibrate and clofibric acid on lipid metabolism in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/09-087.1>

- World Health Organization, 2002. *The Importance of Pharmacovigilance-Safety Monitoring of medicinal products*. *Who* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/0470853093>
- Zurita, J. L., Repetto, G., Jos, Á., Salguero, M., López-Artíguez, M. y Cameán, A. M., 2007. Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.007>



## TECNOVIGILANCIA: EL NUEVO ENFOQUE DEL FARMACÉUTICO

*Mayred Yeselin León García<sup>1\*</sup>*

*Martha Díaz Flores<sup>1</sup>*

*Mariana Ortiz Reynoso<sup>1</sup>*

*Victor Manuel Elizalde Valdés<sup>1</sup>*

Conocer la tecnovigilancia implica la identificación y a la evaluación de incidentes adversos producidos por dispositivos médicos y su uso, así como la detección de los factores de riesgo asociados a estos eventos, que pueden ser o no concomitantes a la terapia farmacológica, por lo que es de gran importancia en el sector farmacéutico y de salud desarrollar una nueva conciencia en los campos de aplicación que se están aperturando, para mantener una buena calidad de vida en los pacientes hospitalizados o no hospitalizados.

Difundir el nuevo concepto de tecnovigilancia como parte de los servicios farmacéuticos, tecnológicos y de salud actuales, permite asegurar la integridad y el cuidado del paciente ante el uso de dispositivos médicos o presencia de eventos adversos asociados a los mismos, donde se conozcan los niveles de operación, los papeles de actuación y la clasificación de los procesos relacionados a la vigilancia activa de los dispositivos médicos.

Esta difusión contribuye a generar conciencia e interés en un tema de salud que está en un proceso creciente. Implementar la tecnovigilancia implica una serie de actividades coordinadas como la conformación de grupos de acción multidisciplinarios, un sistema para el reporte oportuno de incidentes adversos, la generación de análisis e investigaciones y la anticipación de soluciones para disminuir problemas relacionados a los dispositivos médicos en uso.

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* tecnovigilancia\_mcytf@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

El término tecnovigilancia, nos remite a la identificación y a la evaluación de incidentes adversos producidos por dispositivos médicos y su uso, así como la identificación de los factores de riesgo asociados a estos eventos, que pueden ser o no concomitantes a la terapia farmacológica (Rojas et al., 2015). Ello con el propósito de garantizar que los dispositivos médicos que se encuentran disponibles en el mercado funcionen de la manera indicada y que en caso contrario se tomen las medidas correspondientes para corregir y disminuir la incidencia de los eventos adversos.

Se entiende por dispositivos médicos, todos aquellos insumos para la salud que hacen referencia a cualquier instrumento, aparato, implemento, máquina, implante, reactivo para uso *in vitro*, software, material u otro artículo similar para la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y la rehabilitación de enfermedades y dolencias, los cuales deben ser seguros y eficaces (World Health Organization, 2018).

### El inicio de la Tecnovigilancia: antecedentes históricos

Las primeras acciones de tecnovigilancia a nivel mundial se remontan alrededor del año 400 a. C., donde existen los primeros datos del retiro de la terapia farmacológica y el dispositivo médico al descubrir algún evento que pusiera en riesgo la salud del paciente, a fin de mejorar la atención farmacéutica brindada (Madurga, 2014).

Sin embargo, la verdadera base de la regularización de dispositivos médicos a nivel mundial, surge gracias a la Organización Mundial de la Salud (OMS), al establecer que el campo de los dispositivos médicos, al igual que el de los medicamentos, alberga una serie de problemas y riesgos que pueden poner en peligro la terapia farmacológica y el bienestar del paciente durante la atención y recuperación de la salud.

La base establecida por la OMS para el control de dispositivos médicos, surge en Italia en el año de 1927, cuando al sur de esta región apareció la ley *Presidi Medico Chirurgici*, que establecía como requisito el registro y reporte de los productos médicos, así como de sus incidentes adversos, para poder ser corregidos o retirados del uso del paciente, por parte de los profesionales médicos, químicos o farmacéuticos; sin embargo no fue hasta 1941 cuando se logró que esta ley fuera aplicada y entrara en vigencia en esta zona de Europa (Ortiz, Sanchez y Valle, 2010)

En el Reino Unido desde hace más de 50 años se estableció la obligación de reportar al Departamento de Salud cualquier riesgo que se presente o pueda presentarse durante el uso de los dispositivos médicos. El propósito principal de esta medida era que las autoridades sanitarias, médicos, químicos farmacéuticos y químicos clínicos reportaran las inconformidades, incompatibilidades y reacciones secundarias clínicas, farmacológicas y biológicas en los pacientes hospitalizados que usaran dispositivos médicos por periodos de tiempo duraderos o definidos.

En el continente americano el primer acercamiento a la tecnovigilancia desde el área farmacéutica y de atención al paciente, tuvo lugar en 1938, cuando se promulgó el Federal Food, Drug and Cosmetic Act, que permitió actuar contra los dispositivos médicos adulterados, falsificados o que presentaran efectos nocivos a la salud o la farmacoterapia de los pacientes hospitalizados (Hernández y Juárez, 2010). Esta ley permitió aplicar rigurosos requisitos para que los profesionales de la salud estuvieran pendientes de la atención del paciente y de los posibles cambios físicos, biológicos, farmacéuticos y clínicos ocurridos tras, durante o posterior al uso de algún dispositivo médico de soporte a la salud.

Sin embargo, al igual que el desastre de la talidomida provocó la instalación y seguimiento sistemáticos de la farmacovigilancia, para la tecnovigilancia el evento detonante fue el llamado Caso del DIU Dalkon Shield. Entre 1971 y 1974 la empresa AH Robin Pharmaceutical fabricó un dispositivo intrauterino (DIU), conocido como DIU Dalkon Shield, que tenía una hebra multifilamento rodeada por una envoltura de nylon sin sellar que iba del útero a la vagina y que, al ser colocado, provocaba infecciones bacterianas que obligaban la implementación de una nueva terapia farmacológica (Rodríguez, García, Giral, Hernández y Jasso, 2004).

A pesar de que en agosto de 1971 se había advertido a la compañía que debía supervisarse la calidad de estos dispositivos, el químico encargado de la investigación farmacéutica hizo caso omiso de la advertencia y no la reportó. En junio de 1972, el director del proyecto fue alertado por uno de sus médicos asesores de que, en el último mes, seis mujeres portadoras del DIU habían quedado embarazadas después de que les colocaran el dispositivo médico y cinco de ellas habían sufrido aborto séptico. Lamentablemente se siguieron ignorando el control de la seguridad del DIU y los registros de los casos reportados. Incluso se imprimieron folletos del dispositivo, mencionando que no existía relación entre el DIU Dalkon y los partos anormales.

Finalmente, en noviembre de 1973, con el informe de 22 casos de aborto séptico espontáneo, incluyendo un caso letal, la compañía fue obligada, junto con otras compañías de dispositivos médicos intrauterinos, a dar seguimiento puntual a cada una de las pacientes que portaran el dispositivo (Rodríguez y Rueda, 2005); encontrándose que entre 1971 y 1974, al menos 17 mujeres habían fallecido y 209 habían sufrido aborto séptico, además de que 200 000 sufrieron lesiones, enfermedad pélvica inflamatoria, útero perforado e infertilidad, tras la colocación del DIU Dalkon Shield.

Tras la revelación de estos casos, y las notables demandas a la compañía por daños relacionados con esterilidad e infecciones y embarazos no deseados, nació el poderoso incentivo para que la OMS y la Administración de Alimentos y Medicamentos norteamericana (FDA), por sus siglas en inglés Food Drug Administration, impulsaran un proyecto de vigilancia farmacéutica de los dispositivos médicos utilizados en el soporte de una terapia farmacológica, el cual incluía la obligación a los profesionales médicos, farmacéuticos y químicos, de supervisar, monitorear, informar, cambiar, reportar y notificar cualquier incidente adverso relacionado al uso y manejo de dispositivos médicos asociados a la terapia farmacológica, logrando al final implementar un programa total en el cual se manifestaba que todo dispositivo médico utilizado en la terapia debía ser supervisado por un profesional de la salud, para llevar un control exacto que incluyera registro sanitario, manejo, detección, notificación, seguimiento y corrección de las reacciones adversas.

Las medidas anteriores provocaron que para 1980 se establecieran puntualmente por la OMS los primeros procesos para el seguimiento de incidentes adversos a dispositivos médicos; ello dio lugar a la primera investigación documental de registros de tecnovigilancia, misma que condujo a generar tres estrategias para hacer seguimiento de efectos adversos en dispositivos médicos:

1. Presentación de informes de incidentes adversos.
2. Instauración de la vigilancia poscomercialización de dispositivos médicos.
3. Implementación del registro y rastreo de efectos adversos.

Estas estrategias aplicarían para todos los dispositivos médicos que se hubieran visto involucrados durante eventos asociados a o haber causado o contribuido a la muerte o lesiones graves del paciente, o bien, no haber funcionado correctamente y que por

consiguiente fueran susceptible de causar o contribuir a provocar algún daño grave o letal al paciente durante su hospitalización (Becerril Díaz y Bonadi, 2003). Y con ellas, además, nacen conceptos de aplicación basados en la vigilancia activa de los dispositivos médicos:

- a) Incidente adverso: riesgo o daño causado por el manejo del dispositivo médico, que puede causar potencial o bajo daño a toda aquella persona que esté en contacto con el mismo, sea ésta el paciente o sus familiares, el profesional de la salud, o el operador (técnicos o personal de capacitación para el uso de equipos médicos).
- b) Error de uso: acción u omisión que tiene un resultado diferente del previsto por el fabricante del dispositivo médico, ya sea descuidos, equivocaciones y todo uso indebido que se pueda prever (NOM-240-SSA1, 2012).
- c) Evento adverso: riesgo o daño potencial o bajo, que es ocasionado por el dispositivo médico únicamente al paciente que está utilizando el mismo, independientemente de factores externos o concomitantes (Guzmán y Otálvaro, 2012).

De los cuales se diferencian tipos de eventos adversos asociados a dispositivos médicos:

a) evento adverso imprevisto (EAI) o cualquier acontecimiento que no se consideró en el análisis de riesgo realizado durante la fase de diseño y desarrollo del dispositivo médico y que se presenta durante el uso del mismo en condiciones reales conforme a lo señalado, y, b) evento adverso previsto (EAP) o acontecimiento del cual se tiene conocimiento conforme al análisis de riesgo realizado durante la fase de diseño y desarrollo del dispositivo médico (NOM-240-SSA1, 2012). Sin dejar de lado que, para ambos casos se genera una amenaza grave para la salud, que sugiere cualquier riesgo inminente de muerte, lesión o enfermedad graves.

Así, tras la implementación y el diseño de un programa tecnovigilante que monitoreara el correcto manejo y uso de los dispositivos médicos en pacientes hospitalizados, se logró hacer llegar a América Latina un programa de tecnovigilancia, el cual ha tenido tres hitos importantes que a continuación se mencionan cronológicamente:

- a) 1986: la Organización Panamericana de la Salud (OPS) organizó una conferencia internacional de autoridades reguladoras de dispositivos médicos, dedicada a la búsqueda intencionada de efectos adversos y nocivos a la salud de los pacientes.

- b) 1999: la OMS generó la primera reunión de consulta sobre regulación de equipos y dispositivos médicos, donde se expusieron temas alrededor de los registros sanitarios de los dispositivos médicos y los proyectos de estandarización de tecnovigilancia.
- c) 2001-2003: la OMS publicó unas guías para promover los programas de regularización de dispositivos médicos y las medidas a tomar ante los efectos adversos que pueden ocurrir durante su uso en tratamientos médicos (Guzmán y Otálvaro, 2012).

Sin embargo, la palabra tecnovigilancia no fue acuñada sino hasta el año 2013, a partir de que la OMS publicara el libro *Human resources for medical devices*, en el que señala a la tecnovigilancia como la acción fundamental de los profesionales de la salud, biomédico, médico o farmacéutico para la asignación racional, monitoreo y vigilancia de la seguridad y eficacia de cualquier dispositivo médico que acompañe una terapia farmacológica (World Health Organization, 2018).

### Visión actual de la tecnovigilancia

Hoy en día la tecnovigilancia está encaminada a reforzar la salud pública mediante acciones e intervenciones que permitan estimular el desarrollo de nuevas tecnologías de atención primaria a la recuperación de la salud, prevenir y diagnosticar enfermedades, curar lesiones y estimular el desarrollo funcional y prolongado de la vida (Rodríguez y Rueda, 2005), para que el individuo y la comunidad puedan gozar del acceso oportuno y eficaz a los servicios de promoción, prevención, protección específica y recuperación de la salud.

Enfocar esfuerzos en actividades de tecnovigilancia permite la identificación y la cualificación de eventos adversos serios e indeseados producidos por los dispositivos médicos, así como la identificación de los factores de riesgo asociados a estos efectos. Las acciones de tecnovigilancia se basan en la notificación, registro y evaluación sistemática de los efectos adversos a los dispositivos médicos, con el fin de determinar la frecuencia, gravedad e incidencia de los mismos para prevenir su aparición (ProMéxico, 2017).

La vigilancia del correcto funcionamiento de los dispositivos médicos usados en conjunto con una terapia farmacológica, requiere la generación de nuevas técnicas

para la detección, difusión e investigación sobre incidentes adversos de dispositivos médicos durante su uso, que se vean reflejadas en programas de aplicación basados en la tecnovigilancia activa.

Hacer tecnovigilancia no se limita a atender el aspecto básico del control de la calidad en la fabricación los dispositivos médicos utilizados como complemento de la terapia farmacológica, sino que se extiende a garantizar la seguridad y efectividad de estos productos una vez puestos en el mercado, ya sean usados de forma colectiva o individualmente, mediante cuatro rubros:

- a) Garantía de información: corroborando que el diseño del dispositivo médico y los métodos de producción están documentados conforme a la regulación vigente.
- b) Garantía de seguridad: conociendo los riesgos potenciales del dispositivo con anterioridad a su uso en pacientes, usuarios o terceros (personal de salud).
- c) Garantía de eficacia: cuidando que el dispositivo médico logre las características del uso pretendido o desempeño establecidas por el fabricante.
- d) Garantía de calidad: asegurándose de que el dispositivo fabricado proporciona las mismas características de desempeño que el prototipo o diseño, y que no interfiere con la terapia farmacológica.

Para cumplir en su totalidad las garantías de tecnovigilancia, la OMS establece que la forma correcta de realizar esta investigación debe estar basada en los siguientes métodos:

- a) Búsqueda intencionada: es decir, estar al pendiente de los reportes médicos registrados y de la visita médica, donde se dé puntual seguimiento al motivo o proceso del evento asociado al dispositivo médico, desde la ubicación hasta su corrección.
- b) Actividad informada: respondiendo a los reportes puntualmente realizados de forma verbal o escrita por parte del personal médico o de enfermería o bien de pacientes y familiares al responsable de tecnovigilancia de las unidades hospitalarias, mencionando el caso completo frente al evento adverso al dispositivo médico (Rojas et al., 2015).

Con lo cual, el curso actual de la tecnovigilancia está encaminada hacia:

- a) Notificación inicial de eventos adversos, donde se vean involucrados dispositivos médicos con registro.
- b) Reportes de seguimiento y reporte final del incidente adverso que incluyan las acciones preventivas y correctivas.
- c) Informe de tecnovigilancia que dé pie al establecimiento de guías, boletines, programas, o información documentada y publicada.

De este modo, la tecnovigilancia en la actualidad busca establecer un contexto de responsabilidad que abarque el conjunto de conocimientos, prácticas, procedimientos y actividades que se originen en las necesidades de salud, y cuyos instrumentos hospitalarios o dispositivos médicos sean claramente diseñados y utilizados para las acciones de promoción, prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación, a partir de experiencias recabadas de la investigación, que implementen en el futuro una base de información de fácil acceso, para brindar servicios y productos de calidad siempre con vistas al paciente y a la salud pública (Calderón, 2004).

Niveles de operación, actores y responsabilidades de la tecnovigilancia

Vigilar los dispositivos médicos no es trabajo de unos cuantos, sino que se trata de un trabajo en equipo en el que se ven involucrados productores, distribuidores, personal de la salud (médicos, enfermeros, químicos, farmacéuticos...), pacientes y familiares, para monitorear todos y cada uno de los cambios e incidentes adversos que surjan alrededor de los dispositivos médicos y su uso.

Para esto, siempre es importante tener en cuenta, que existen dos niveles de operación de la tecnovigilancia, en los cuales el papel del profesional farmacéutico ocurre de diferente manera; éstos niveles son:

1. Fase I o precomercialización: ocurre antes de que el dispositivo médico salga al mercado y es necesaria para que a los productos se les otorgue un registro sanitario o permiso de comercialización. El papel del farmacéutico especializado consiste en la implementación y realización de programas e inspecciones de seguridad y eficacia.

2. Fase II o poscomercialización: se implementa a través de programas de tecnovigilancia, donde el trabajo del farmacéutico especializado consiste en elaborar una serie de actividades orientadas a la identificación, evaluación, gestión, seguimiento y divulgación de la información oportuna relacionada con los eventos e incidentes adversos, así como la identificación de los factores de riesgo asociados a estos efectos (Invima, 2012).

A partir de estos niveles de operación, en México se han logrado abrir espacios de farmacia hospitalaria desde los que se buscan crear sistemas y programas de tecnovigilancia que cubran las necesidades de salud en torno a los dispositivos médicos. Esto requiere la participación de distintos sectores profesionales y de promoción a la salud, entre los cuales están las autoridades sanitarias, los profesionales de la salud, los fabricantes y distribuidores de los dispositivos médicos y los pacientes y familiares; estos actores se describen a continuación:

- a) Secretaría de Salud, que actúa a nivel nacional y cuyas funciones se centran en:
  - Generar la reglamentación relacionada con el desarrollo de programas nacionales y estatales de tecnovigilancia.
  - Evaluar la información generada por los programas de tecnovigilancia para establecer políticas pertinentes.
- b) Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), que se encarga de:
  - Coordinar y dar seguimiento a los programas de tecnovigilancia.
  - Generar los mecanismos para identificar, recolectar, evaluar y gestionar la información sobre los eventos e incidentes adversos asociados a los dispositivos médicos usados por la población en el territorio nacional.
  - Aplicar medidas de prevención, vigilancia, control y seguimiento a los casos reportados.
- c) Centros nacionales y estatales de farmacovigilancia y tecnovigilancia, los cuales realizan las actividades de:
  - Implementar y garantizar la continuidad de los mecanismos para identificar, recolectar y gestionar información sobre eventos asociados a dispositivos médicos usados a nivel territorial, designando un responsable de dicho programa, quien será el contacto que debe reportarse a la COFEPRIS.
  - Transmitir a la COFEPRIS inmediatamente todo reporte de evento o incidente adverso serio, y trimestralmente un reporte de los eventos considerados no serios.

- d) Profesional farmacéutico en los servicios de salud:
  - Diseñar e implementar un programa de tecnovigilancia en la institución de salud que participe.
  - Actuar como un profesional competente en el tema, responsable del programa de tecnovigilancia y las actualizaciones en el mismo.
  - Desarrollar actividades de promoción y formación con los profesionales de la salud de la institución, para garantizar una atención farmacéutica completa.
  - Informar a COFEPRIS todo evento o incidente adverso serio, dentro de las 72 horas siguientes a la ocurrencia, y trimestralmente a la Secretaría de Salud el consolidado de los eventos considerados no serios.
- e) Usuarios, su única y principal función es:
  - Reportar a su farmacéutico hospitalario la ocurrencia de un evento o incidente adverso con dispositivos médicos en combinación o no con su tratamiento farmacéutico.
- f) Fabricante, importador o distribuidor, cuyas responsabilidades de tecnovigilancia son:
  - Conocer y aplicar la normativa vigente sobre tecnovigilancia, así como asumir las obligaciones y responsabilidades que las normas les imponen.
  - Tomar las acciones preventivas y correctivas que sean exigidas por los programas de tecnovigilancia (Invima, 2012).

De esta manera la continua incorporación de los programas de tecnovigilancia, asumiendo sus dos niveles de aplicación (nacional y estatal), e integrando distintos actores y responsabilidades, permite la administración de los riesgos hospitalarios y el control de la calidad de los productos e insumos médicos que interactúan con la terapia farmacológica y la salud del paciente.

### Vigilancia activa a eventos adversos con dispositivos médicos

Desde la aparición de la tecnovigilancia como proceso del cuidado de la seguridad y eficacia de dispositivos médicos, la OMS y la OPS, se han preocupado por establecer programas que buscan crear y fortalecer los sistemas de regulación de estos insumos para la salud, buscando las herramientas necesarias para satisfacer una atención farmacéutica, médica, sanitaria y tecnológica de calidad. Así, con el fin de garantizar el

impacto de la tecnovigilancia, se ha generado un proceso de vigilancia activa, basado en las dos fases de actividad que se describen a continuación:

- a) Descripción de la seguridad como un proceso de gestión de riesgos, que debe realizarse durante todo el ciclo de vida de los dispositivos médicos, evaluando su seguridad, eficacia y mantenimiento del acondicionamiento de la calidad de los dispositivos médicos. Esto debe demostrarse antes de la concesión del registro sanitario, o bien antes de que la obtención del permiso de comercialización (Luengas, 2009). La finalidad de este proceso es reducir los riesgos de precomercialización, evitando la incidencia de problemas de producción cuando los insumos médicos lleguen al consumidor final.
- b) Vigilancia a eventos adversos como parte de la búsqueda dirigida, que consiste en una serie de actividades orientadas a la identificación, evaluación, gestión, seguimiento y divulgación oportuna de la información relacionada con los eventos e incidentes adversos y problemas de seguridad que se presenten durante la utilización de los dispositivos médicos ya comercializados (INVIMA, 2012), en donde el fin primordial es eliminar y detectar para corregir toda respuesta no esperada en el uso de estos insumos de salud en la fase de poscomercialización.

Sin embargo, la vigilancia activa de los incidentes y eventos adversos a dispositivos médicos, además de incluir las dos fases anteriores, debe contemplar un aspecto final de vigilancia basado en la implementación de guías y procedimientos para la regularización, reporte y atención de los incidentes no esperados alrededor de los dispositivos médicos, cuya misión es conducir el actuar de los profesionales de la atención a la salud hacia una política clara que establezca medidas competentes que permitan diferenciar los eventos e incidentes adversos presentados determinando la frecuencia, gravedad e incidencia de los mismos para ultimadamente prevenir su aparición (Invima, 2012).

De este modo, el principal objetivo de la implementación de una vigilancia activa alrededor de los dispositivos médicos antes o después de su comercialización, es prevenir, disminuir o atender los daños no intencionados al paciente, profesional de la salud, operador o incluso al medio ambiente. Para ello, los eventos e incidentes adversos de estos insumos se clasifican de la siguiente forma:

- a) Evento adverso serio: evento no intencionado que pudo haber llevado a la muerte o al deterioro serio de la salud del paciente, como consecuencia de la utilización de un dispositivo médico. Se considera deterioro a la salud la aparición de eventos como (Castillo, 2014):
  - Muerte, enfermedad o daño que amenace la vida.
  - Daño de una función o estructura corporal.
  - Condición que requiera una intervención médica o quirúrgica para prevenir un daño permanente de una estructura o función corporal.
  - Evento que lleve a una incapacidad permanente parcial.
  - Evento que necesite una hospitalización o una prolongación en la hospitalización.
  - Evento que sea el origen de una malformación congénita.
- b) Evento adverso no serio: evento no intencionado, que no pone en riesgo la salud o la vida, que puede tener recuperación sin necesidad de terapia farmacológica o con intervención farmacológica que no daña, agrava o complica más la salud del paciente, como consecuencia de la utilización de un dispositivo o aparato de uso médico (Osorio, 2015).
- c) Incidente adverso serio: potencial riesgo de daño no intencionado que pudo haber llevado a la muerte o al deterioro serio de la salud del paciente, profesional de la salud, o cualquier persona involucrada directa o indirectamente con el uso del dispositivo médico, pero que, por causa de la intervención de un profesional de la salud, o una barrera de seguridad, no generó un desenlace adverso (Rojas et al., 2015).
- d) Incidente adverso no serio: potencial riesgo o daño no intencionado que no causa complicaciones médicas, quirúrgicas o traumáticas al paciente, profesional o persona ajena que estuvo en contacto con el dispositivo médico, pero que solo genera debilidad en el estado de salud sin desencadenar en actividades serias o eventos adversos (Castillo, 2014).

Como puede verse, la vigilancia activa de los dispositivos médicos se fundamenta en los riesgos potenciales relacionados con su uso, correlacionando estos riesgos con actividades complementarias como el servicio hospitalario, la preparación del personal de la salud, la notificación e informe oportuno, el grado de invasividad del dispositivo médico, la duración de contacto con el organismo y la generación de procedimientos de actuación en torno a la tecnovigilancia.

Partiendo de la vigilancia activa, los eventos no esperados e indeseables de los dispositivos médicos pueden categorizarse en respuesta a los siguientes criterios:

- 1) Entendiendo el lugar de uso, respondiendo al espacio físico y al tipo de dispositivo médico que se utiliza. Las clasificaciones pueden ser (Guzmán y Otálvaro, 2012):
  - Ambulatorio: los causados por dispositivos médicos de curación o utilizados en la consulta dental.
  - Prehospitalario: los causados por todos los dispositivos médicos asociados a la toma de signos vitales o monitoreo.
  - Consulta externa: los causados por los dispositivos médicos utilizados en una consulta médica, desde balanzas y toma de signos, hasta curaciones y toma de muestras.
  - Urgencias: los asociados al uso del dispositivo médicos dentro un proceso de internamiento hospitalario.
  - Traslado: los asociados a los daños causados por el uso de equipos y dispositivos médicos dentro del proceso de traslados hospitalario, ya sea dentro o fuera de la ambulancia.
  - Implante: los relacionados a eventos no esperados con dispositivos médicos dentro del proceso de colocación de implantes.
- 2) Por riesgo de acción, o a la forma en que funcionan los dispositivos médicos utilizados, dentro de los que están las clasificaciones de (Osorio, 2015):
  - Invasividad: los causados cuando el dispositivo médico atraviesa parcial o totalmente la superficie corporal.
  - Actividad: los producidos cuando se necesita de corrientes eléctricas para el funcionamiento de los dispositivos médicos.
- 3) Por el tiempo de uso, asociado al tiempo de vida que permanece activo el dispositivo médico en el cuerpo humano, dentro de los que tenemos (Guzmán y Otálvaro, 2012):
  - Transitorio: cuando los dispositivos médicos que causaron el evento adverso permanecieron por no más de 30 minutos en el cuerpo humano.
  - Corto plazo: los causados por el dispositivo médico que estuvo en contacto con el cuerpo humano, entre 31 minutos y 60 días.
  - Largo plazo: los ocasionados por dispositivos médicos que permanecieron en contacto con el cuerpo humano por más de 60 días, sin hacer cambio del mismo.

- 4) Por la naturaleza de la aplicación, los asociados al uso del dispositivo médico y el contacto que éste tiene con el cuerpo humano, tales como (Rojas et al., 2015):
  - Baja naturaleza: los causados por los dispositivos médicos de uso en curaciones y sin actividad dentro de la superficie corporal.
  - Moderada naturaleza: los causados por dispositivos médicos punzo cortantes, que atraviesan total o parcialmente la superficie corporal.
  - Alta naturaleza: los causados por dispositivos médicos que invaden el cuerpo humano, órganos y tejidos.
  - Muy alta naturaleza: los relacionados con los dispositivos médicos que se quedan permanentemente en el cuerpo humano o por un periodo de tiempo prolongado.
- 5) Por el daño causado, en relación a la gravedad del riesgo inherente a la utilización de los insumos de la salud, que pueden ser (Osorio, 2015):
  - Serio o clase III: los que implican la pérdida total o parcial de la función de un órgano o sistema.
  - No serio o clase II A: los que generan daño o riesgo que puede ser recuperado sin la asistencia médica.
  - Moderado o clase II B: los que requieren tratarse con intervención médica o farmacológica distinta a la de la patología inicial.
  - Leve o clase I: los asociados a daños mínimos o a la invasividad de un cuerpo extraño en el cuerpo humano, como son las jeringas.

Esta categorización es el punto de partida de la vigilancia activa de eventos adversos asociados a dispositivos médicos, en tanto establece conceptos que pueden aplicarse cuando sea necesario y conforme a los recursos disponibles que son indicativos de los diferentes procesos reguladores de los dispositivos médicos. La tecnovigilancia no puede perder de vista que su finalidad es la seguridad del paciente cuando ésta depende de la calidad y eficacia del dispositivo médico, para lo cual debe garantizar el conocimiento del profesional de la salud y el reporte oportuno de todas las observaciones en torno a estos insumos de salud, considerando que los dispositivos médicos están diseñados para prevenir, diagnosticar o corregir problemas de salud, y no para agravar la estancia intrahospitalaria o extrahospitalaria de los pacientes en atención a su patología de diagnóstico (Ruiz, González y Alcalde, 2015).

## Los nuevos retos de la tecnovigilancia en México

Dentro del territorio mexicano existen más de 1000 diferentes dispositivos médicos que son utilizados con regularidad. La principal necesidad en términos de la tecnovigilancia está encaminada a la prevención, detección, investigación, evaluación y difusión de información sobre incidentes adversos o potencialmente adversos relacionados a los mismos.

El hecho de saber que todos los dispositivos médicos poseen cierto grado de riesgo (el cual podría causar problemas en circunstancias específicas) hace que las autoridades sanitarias en México centren sus objetivos en dos caminos en particular:

- 1) La identificación y evaluación de incidentes adversos producidos por los dispositivos médicos en uso.
- 2) La identificación de los factores de riesgo asociados a éstos.

Así, estructurar un sistema de vigilancia para garantizar la calidad y efectividad de estos productos, involucra el establecimiento de sistemas operativos y procesos que minimicen la probabilidad de incidentes adversos y maximicen la probabilidad de detectarlos cuando ocurran (Tejada y Ibañez, 2008).

Para México, la implementación de la tecnovigilancia es parte de las actividades de vigilancia farmacéuticas y clínicas. El reto principal es la generación y puesta en marcha de programas de control de dispositivos médicos en las instituciones prestadoras de servicios de salud a nivel nacional. El proyecto nacional de tecnovigilancia establece como elementos mínimos el requisito de calidad de los dispositivos médicos y la prevención, detección, investigación y difusión de información sobre incidentes y eventos adversos a los dispositivos médicos durante su uso (SSA-Secretaría de Salud, 2012).

Es importante mencionar que la aplicación de un proyecto nacional de tecnovigilancia se ha visto retrasado por situaciones que involucran: a) la falta de reporte de incidencia por parte de los usuarios, b) el desconocimiento del área hospitalaria farmacéutica o del profesional destinado a la atención de eventos adversos asociados a los dispositivos médicos, c) la desinformación de las características que constituyen un incidente o evento adverso y d) el desconocimiento de las características de calidad y seguridad que deben cumplir los dispositivos médicos. Estos factores han impedido establecer las políticas, programas y procedimientos necesarios en materia de tecnovigilancia en el territorio nacional (Olivares, 2012).

Como lo enuncia la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), en su versión 2017 en el Suplemento de actividades de tecnovigilancia, el reto actual es contar con una guía o procedimientos específicos que describan las actividades de tecnovigilancia y que se establezca con claridad el papel del farmacéutico como el profesional encargado de la vigilancia de los dispositivos médicos, así como su rol fundamental en la prevención, notificación, difusión y educación de la tecnovigilancia.

Estas guías o procedimientos para garantizar la seguridad de los dispositivos médicos y la protección de la salud del paciente, además de facilitar el procedimiento para realizar las actividades de tecnovigilancia, deben considerar tres aspectos básicos:

- 1) Notificación de incidentes: mediante la creación de unidades de tecnovigilancia, que cuenten con un responsable capacitado en el área, al que se le dé aviso de cualquier evento suscitado alrededor del uso de los dispositivos médicos y que se encargue de ser el interlocutor entre pacientes y el equipo de profesionales de la salud.
- 2) Acciones correctivas o preventivas: basadas en la preparación del profesional farmacéutico que se encargue de dar a conocer las responsabilidades y acciones de la tecnovigilancia, recabando datos y generando acciones informativas que acerquen a los usuarios a la aplicación de la tecnovigilancia.
- 3) Informe de tecnovigilancia: donde mediante recolección de datos e información, se puedan dar a conocer a los servicios de salud de los sectores público, social y privado, los casos acerca de efectos secundarios y eventos adversos asociados al uso insumos para la salud, con la finalidad de generar criterios de clasificación y acciones de prevención (FEUM, Dirección General de Medicamentos, 2017).

En México, echar a andar el proceso de la tecnovigilancia tiene como principal reto ser contribuir al crecimiento económico y tecnológico del país, no sólo disminuyendo costos inherentes a los gastos médicos de atención de los eventos adversos a los dispositivos médicos, sino en la industria de los dispositivos médicos, desarrollando nuevos productos de calidad, seguridad y eficacia comprobada competitivos internacionalmente.

La tecnovigilancia requiere de procedimientos estandarizados que evalúen calidad, seguridad, efectividad y eficacia de los dispositivos médicos, tomando en cuenta que la demanda de mejores productos la calidad no se debe ver afectada con el cumplimiento regulatorio de los productos.

## Camino de la tecnovigilancia en el Estado de México: un proceso en construcción

Cubrir las necesidades de atención médica a nivel nacional y estatal, no sólo requiere entre muchas otras cosas asegurar que los dispositivos médicos utilizados en conjunto con la terapia farmacológica garanticen el bienestar de los pacientes. Ello requiere que las instituciones de educación superior generen recursos humanos capacitados, y que los hospitales de los distintos niveles de atención contraten a estos profesionales expertos en el área, lo cual tiene implicaciones presupuestales.

Si a nivel nacional el proceso de atención para generar vigilancia activa a los dispositivos médicos se ha dado a paso lento, en el Estado de México, el camino hacia la tecnovigilancia apenas comienza a tomar un rumbo claro. El primer paso importante que se han logrado es la implementación del Centro Estatal de Farmacovigilancia y Tecnovigilancia, que para el ámbito de vigilancia activa de dispositivos médicos ha puesto en marcha tres actividades primordiales que señalan:

- a) Notificación inicial de eventos adversos involucrados dispositivos médicos que se encuentran en el mercado de insumos para la salud.
- b) Reportes de seguimiento y reporte final del incidente adverso que incluyan las acciones preventivas y correctivas.
- c) Informe de tecnovigilancia que complementen guías y procedimientos de operación que puedan ser aplicados en las instituciones de salud y además ser dados a conocer a la población en general (Sedeño, 2014).

Si bien las actividades de tecnovigilancia aún están en etapa de desarrollo en Estado de México, hay que reconocer que en la farmacovigilancia se han tenido más aciertos, y que éstos son la puerta de entrada para la tecnovigilancia. Las acciones en torno a los eventos adversos asociados al uso de dispositivos médicos, parten del fortalecimiento de las actividades de farmacovigilancia; es decir, la tecnovigilancia es una línea de desarrollo conjunta a la farmacovigilancia.

Desde el Centro Estatal de Farmacovigilancia y Tecnovigilancia se han podido establecer los lineamientos sobre los cuales se deben realizar las actividades de tecnovigilancia, así como el control sobre estos dispositivos médicos. El objetivo, por supuesto, es tomar las medidas preventivas y correctivas necesarias para disminuir el número de incidentes que puedan causar algún deterioro de la salud de los pacientes, profesionales de la salud, operadores y familiares (Ruíz, 2018).

De esta forma, el verdadero reto de la tecnovigilancia en el Estado de México y en todo el país, más allá de reducir los incidentes adversos a dispositivos médicos, es posicionar el papel del farmacéutico dentro del campo de los servicios de atención a la salud que garanticen la recuperación y el bienestar del paciente, dentro de las siguientes acciones:

- Selección: de medicamentos y dispositivos médicos, mediante un proceso multidisciplinario que asegure el acceso a los fármacos e insumos médicos.
- Adquisición: de insumos para la salud, garantizando la disponibilidad de éstos.
- Asesoramiento técnico: aportar información oportuna en relación a los dispositivos médicos y su terapia farmacológica conjunta, respetando las normas vigentes y notificando la aparición de incidentes adversos.
- Recepción, almacenamiento y conservación de insumos farmacéuticos, en cumplimiento regulatorio.
- Farmacovigilancia y tecnovigilancia: mediante el formulario de notificación de efectos adversos.

El farmacéutico es el profesional líder para hacer un uso racional, informado, seguro y de calidad de los dispositivos médicos, y asegurar el acceso a la información, y en él recae la incorporación de todos los servicios, acciones, prevenciones y correcciones de tecnovigilancia (Calderón, 2004).

## CONCLUSIÓN

Si bien la vigilancia activa de los dispositivos médicos en el Estado de México es un proceso que pretende rendir frutos a corto, mediano y largo plazo, hay que analizar que, de los cerca de 17 millones de habitantes de esta entidad, gran parte de la población usuaria de los servicios asistenciales de salud se encuentra en edad pediátrica. Ello hace que los pacientes estén en una etapa de mayor vulnerabilidad y, en este sentido, la calidad, seguridad y eficacia de los dispositivos médicos que acompañan su terapia farmacológica debe ser procurada y atendida a la brevedad (Ruíz, 2018).

Junto con el camino hacia la implementación de un modelo completo de tecnovigilancia en el Estado de México, también se debe hacer énfasis en generar guías y procedimientos de vigilancia destinados exclusivamente a los grupos vulnerables de la población. Ello requiere la creación de una red coordinada de vigilancia que

involucre a todos los actores y sectores: institutos de atención pediátrica, profesionales de la salud de los centros hospitalarios públicos y privados, fabricantes, importadores y distribuidores de dispositivos médicos, pacientes y familiares y público en general.

Al ser un tema poco conocido, el camino de la implementación de la tecnovigilancia debe enfocarse en la toma de medidas de búsqueda, corrección y notificación de incidentes adversos a dispositivos médicos, como una necesidad que nace desde el área química y farmacéutica, donde se pueda implementar un programa de atención al paciente, y se mantenga un monitoreo constante de los dispositivos médicos, estando al tanto de los cambios clínicos, farmacológicos y biológicos del paciente pediátrico en relación al dispositivo médico en uso, pero también monitorear los registros sanitarios vigentes, los nuevos dispositivos médicos tecnológicos y científicos, y las medidas correctivas que se puedan aplicar (Calderón, 2004).

Estas consideraciones traerían consigo respuestas positivas, encaminadas a:

- La oportuna atención de reacciones adversas a los dispositivos médicos evitando que la estancia hospitalaria se complique, agrave o dañe otros tejidos u órganos.
- Sentar las bases para mantener un reconocimiento y control de los registros sanitarios de dispositivos médicos, que comprenda el conocimiento de los posibles efectos adversos que pueden presentarse en relación a los mismos, la forma de corregirlos, la terapia farmacológica adecuada al uso del dispositivo.
- Establecer guías fármaco y tecno terapéuticas plenamente sustentadas con base a reportes médicos, farmacológicos, sanitarios y normativos, que en lo posterior sean documentos de referencia para saber cómo responder y actuar ante un evento asociado a reportes de fármaco y tecnovigilancia (Osorio, 2015).

Así, el diseño de un programa de tecnovigilancia enfocado en cualquier persona en el territorio estatal que haya cursado por reacciones adversas a dispositivos médicos, se enfoca en la necesidad de generar grupos de apoyo que puedan responder a las complicaciones terapéuticas y farmacéuticas de los pacientes hospitalizados bajo tratamiento farmacológico y con apoyo de éstos insumos a la salud, evitando que los daños se vean elevados de moderados a letales. Siendo necesario encaminar el proyecto de tecnovigilancia desde cualquier área de la salud, en virtud de los conocimientos técnicos, experiencia, educación o capacitación, para participar activamente en la búsqueda, corrección y notificación de incidentes adversos a dispositivos médicos.

## REFERENCIAS

- Becerril, M., Díaz, A. y Bonadi, A., 2003. *Introducción a la Farmacovigilancia. Comisión Nacional para la Protección de Riesgos Sanitarios*. México: Comisión Nacional para la Protección de Riesgos Sanitarios.
- Calderón, G., 2004. Farmacia pasado, presente y futuro. *Revista Del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*, 23 (4), 185.
- Castillo, M., 2014. Tecnovigilancia 1. In Secretaría de Salud del Estado de México, *Tecnovigilancia* (17). Estado de México: Unidad Estatal de Farmacovigilancia.
- FEUM Dirección General de Medicamentos, I. y D., 2017. Actividades de farmacovigilancia, 1-9.
- Guzmán, J. y Otálvaro, E., 2012. La implementación de la tecnovigilancia en la región: un modelo en construcción. In COFEPRIS, *Primer foro nacional de farmacovigilancia y tecnovigilancia* (16). México.
- Hernández, M. y Juárez, H., 2010. Artículo de revisión Farmacovigilancia en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 31 (5), 227-232.
- INVIMA. (2012). *ABC de Tecnovigilancia*. (INVIMA, Ed.). Colombia.
- Luengas, S., 2009. Seguridad del paciente: conceptos y análisis de eventos adversos. *Centro de Gestión Hospitalaria* [en línea], 48, 6-19. Disponible en: <https://doi.org/http://www.cgh.org.co/imagenes/calidad1.pdf>
- Madurga, M., 2014. Farmacovigilancia, la “madre” de todas las vigilancias. *Revista O.F.I.L.* [en línea], 24 (4), 201-203. Disponible en: <https://doi.org/ISSN 1699-714X>
- NOM-240-SSA1., 2012. NOM-240-SSA1-2011, Instalación y operación de la tecnovigilancia. *Diario Oficial de La Federación*, 1 (1), 14.
- Olivares, F. J., 2012. Tecnovigilancia en México. In *XVII Congreso Nacional de Responsables sanitarios de la industria químico farmacéutica*. (1-26). Mexico.
- Ortiz, J., Sanchez, P. y Valle, C., 2010. Tecnovigilancia: complemento del sistema de calidad de la atención en salud. *Universidad CES*, 1 (1), 61.
- Osorio, L., 2015. Lo que todos debemos saber de las buenas prácticas clínicas. *Biomédica*, 35 (5), 274-284.
- ProMéxico. (2017). Documento Sectorial de Dispositivos Médicos. *DOF Diario Oficial de La Federación*, (1), 45.

- Rodríguez, H. y Rueda, C., 2005. Sistema de Información para la vigilancia en salud pública: Propuesta conceptual y tecnológica. *Organización Panamericana de La Salud. Ministerio de La Protección Social.*, 1 (1), 1-80.
- Rodríguez, L., García, J. L., Giral, C., Hernández, D. y Jasso, L., 2004. Farmacovigilancia I. El inicio. *Rev Med IMSS*, 42 (4), 327-329.
- Rojas, M., Reyes, R., Concha, A. M., López, M. C., Palma, J., Pañeda, D., ... Martínez, P., 2015. *Guía De Tecnovigilancia : Notificación De Eventos Adversos Y (ISPC)*. Chile.
- Ruíz, J., 2018. Vigilancia de los dispositivos médicos: Tecnovigilancia. *COFEPRIS Protección y Salud*, 3 (11), 4-5.
- Ruiz, P., González, C. y Alcalde, J., 2015. Análisis de causas raíz. Una herramienta útil para la prevención de errores. *Revista de Calidad Asistencial* [en línea], 20 (2), 71-79. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1134-282X\(08\)74726-2](https://doi.org/10.1016/S1134-282X(08)74726-2)
- Sedeño, C., 2014. Retos de los servicios farmacéuticos en el siglo XXI. *Revista Cubana de Farmacia.*, 48 (1), 1-4.
- SSA-Secretaría de Salud, 2012. Reglamento de Insumos para la Salud (RIS). In Sexenio presidencial: Felipe Calderon Hinojosa 2006-2012, *decreto presidencial de la Secretaria de Salud-Presidencia de la república* (Vol. 1). México.
- Tejada, M. C. y Ibañez, C. G. 2008. Technical and clinical evaluation of biomedical technology in the process of acquisition: a focus in healthcare technology. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2 (4), 34-45.
- World Health Organization, 2018. Safety of medicines: A guide to detecting and reporting adverse reactions. Why do health professionals need to take action? *British Medical Journal*, 4 (5834), 192



# CONOCIMIENTOS, HABILIDADES Y ACTITUDES EN FARMACOVIGILANCIA ENTRE PROFESIONALES DE LA SALUD Y UTILIDAD DE LAS INTERVENCIONES EDUCATIVAS COMO HERRAMIENTA DE MEJORA DE ESTOS

*Jesus Mata Maldonado<sup>1</sup>*  
*Mariana Ortiz Reynoso<sup>1\*</sup>*

Desde hace varios años, la farmacovigilancia (FCV) se ha encargado de la pesquisa, informe y prosecución de las reacciones adversas a los medicamentos (RAM), sin embargo, su estudio aún es irregular. Se han hecho grandes intentos colectivos para incentivar el reporte de RAM, no obstante, subsisten fluctuaciones entre las naciones miembros del Uppsala Monitoring Centre (UMC). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de homogenizar los conocimientos, actitudes y habilidades en FCV (CAHFV) con que cuentan los profesionistas sanitarios. En este capítulo, se examinan algunos trabajos actuales que versan en la estimación de CAHFV en farmacovigilancia entre profesionales del área de la salud en el mundo, notándose que en la mayoría de los estudios los participantes cuentan con pobres conocimientos y actitudes desfavorables ante la FCV.

Por otra parte, se presentan los resultados de una investigación llevada a cabo sobre las implicaciones de una intervención educativa (programa de adiestramiento) en los conocimientos en FCV y en el número y calidad de reportes de RAM en personal de enfermería y medicina de un hospital público de segundo nivel de atención ubicado en el Estado de México. Por tal motivo, se estructuró y aplicó un instrumento de evaluación de conocimientos previa y seguidamente a la intervención y se dio seguimiento a los reportes de RAM efectuados en dicho periodo. Los hallazgos obtenidos fueron interpretados con ayuda de métodos estadísticos descriptivos y de comparación. Después de la intervención educativa en los sujetos, los conocimientos en FCV incrementaron de manera sustancial en el personal de enfermería; la cifra

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* mortizr@uaemex.mx

de notificaciones de RAM se acrecentó al igual que la calidad a su máximo grado; de manera que es fundamental instruir ininterrumpidamente en el campo de la FCV.

## INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, los fármacos se utilizan con el fin de curar, prevenir, manejar o reducir las patologías en seres humanos coadyuvando en una mejor calidad de vida para el paciente enfermo. Sin embargo, es bien sabido desde la antigüedad que existen riesgos intrínsecos a la farmacoterapia entre los cuales se hallan las RAM, objeto de estudio de la FCV.

Una RAM es toda respuesta perjudicial y no esperada que se presenta en el paciente ante el consumo de un medicamento en la posología adecuada utilizada con fines profilácticos, diagnósticos o terapéuticos. Por otro lado, la FCV se refiere al estudio y actividades encaminadas a detectar, evaluar, comprender y prevenir efectos adversos u otros problemas relacionados con los medicamentos (World Health Organization, 2002).

Entre las actividades concernientes a la FCV están la valoración de las RAM, la confección de planes de gestión de riesgos e informes periódicos de seguridad, así como de estudios de seguridad poscomercialización y más. La FCV es pues una disciplina que involucra a diversos actores, principalmente a los pacientes, instituciones de salud, farmacéuticas, nosocomios y por supuesto, a los profesionistas sanitarios (Secretaría de Salud, 2009).

El personal de enfermería, medicina y farmacia es esencial en la FCV puesto que es durante la práctica clínica habitual cuando se pueden detectar y reportar en mayor medida las sospechas de RAM (SRAM) en los pacientes. Además, tiene el deber de enseñar y sensibilizar a la población sobre la trascendencia de la FCV como herramienta de calidad y seguridad de la farmacoterapia.

Para un adecuado desarrollo de la FCV en los hospitales, se debe iniciar con la formación del personal de salud para la notificación espontánea de SRAM o si se cuenta con un equipo de farmacéuticos ellos pueden llevar a cabo una FCV intensiva (Rosete Reyes, 2011).

Y es que la morbilidad e incluso la mortalidad derivadas del empleo de medicamentos son factores de preocupación para el sistema sanitario dado que las

RAM generan ingreso hospitalario o prolongan la estadía del paciente afectado y si se trata de RAM consideradas graves pueden dejar huellas permanentes u ocasionar la muerte (Salas Rojas, Pérez Morales, Meléndez López y Castro Pastrana, 2012). Adicionalmente, hay que recordar que los ensayos clínicos a menudo son bastante restringidos a una población en particular, y aun aquellos que son multicéntricos, difícilmente los datos obtenidos sobre seguridad y eficacia del medicamento ensayado se pueden extrapolar a todas las personas en especial de quienes se encuentran en los extremos de la vida, las mujeres o las que presentan patologías concomitantes y crónico-degenerativas (Gómez Oliván, Téllez y López, 2005).

El sector salud también se ve fuertemente impactado, económicamente hablando, por la incidencia de RAM entre los pacientes. Por mencionar un ejemplo, se ha llevado a cabo un estudio en un hospital comunitario de enseñanza de San Luis Potosí, México en el que se estimó el costo promedio de atención de eventos adversos hasta en \$117 440.00 de los cuales 83.25% fueron dictaminados como prevenibles (Gutiérrez Mendoza, Torres Montes, Soria Orozco, Padrón Salas y Ramírez Hernández, 2015).

Teniendo en cuenta que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha intentado estandarizar los métodos de vigilancia de las RAM en los países que conforman el UMC, hoy en día persiste la desinformación sobre la FCV y las RAM empleando diversos enfoques. Esto se acentúa en centro y Sudamérica, así como en el continente asiático dado que en estas regiones no es sino hasta las dos últimas décadas cuando se han puesto en ejecución sistemas de FCV a través de sus correspondientes Centros Nacionales de FCV (World Health Organization, 2002). En este sentido, es imperante homologar las tácticas de adiestramiento en FCV, especialmente entre los profesionistas que laboran en hospitales.

En un ejercicio para instruir en FCV a los nacientes profesionistas sanitarios, se han hecho modificaciones a la currícula de las licenciaturas y posgrados afines a ciencias de la salud, insertando tópicos como FCV, RAM y metodologías de reporte de SRAM (Rodríguez Carranza, Vidrio y Campos Sepúlveda, 2008). Cabe resaltar en el planeta existen escasos datos relativos a los CAHFV en vocacionales de la salud (Mata Maldonado, Ortiz Reynoso y Islas Flores, 2018).

Para mejorar la inserción de la FCV en los hospitales es primordial evaluar los CAHFV iniciales de los actores implicados con ayuda de instrumentos validados y, de esta manera contar con un sustento teórico para el trazado de planes de intervención.

Entre los años 2007 y 2017 se han investigado ampliamente los CAHFV entre profesionistas sanitarios. Se han difundido cerca de 90 estudios mayoritariamente transversales y conducidos en al menos 30 naciones de Asia (donde destaca la India), Europa, América y algunos en África; empleando estadísticos descriptivos y pruebas de correlación (Abubakar, Simbak y Haque, 2014; Bhagavathula, Elnour, Jamshed y Shehab, 2016; Mata Maldonado et al, 2018).

De manera unánime, en dichos estudios se utilizaron cuestionarios validados con anterioridad. En contraste, en México son contadas las investigaciones sobre CAHFV en profesionales de la salud.

En este capítulo, en primera instancia, se hace un breve recuento de algunos estudios sobre CAHFV efectuados a nivel mundial del 2007 al 2017, con el objeto de brindar un panorama general del estado actual de la FCV en el mundo. Posteriormente, se comenta la importancia de las intervenciones educativas dirigidas a profesionales de la salud, como parte de las actividades de FCV y su impacto en la mejoría de CAHFV. Finalmente, se presentan los resultados obtenidos en un hospital ubicado en el Estado de México, como un primer esfuerzo por realizar estudios en el campo en México.

## Conocimientos, actitudes y habilidades en farmacovigilancia en profesionales de la salud en diferentes países

### Conocimientos en FCV

Diversos trabajos de investigación producidos a nivel mundial y que fueron consultados por el trabajo de revisión de Mata (2018) muestra que, en conjunto, los profesionistas sanitarios cuentan con conocimientos insuficientes en FCV. Muchos estudios concuerdan en la necesidad de formar incesantemente a las personas en FCV y de fortificar los planes de estudio de las licenciaturas de ciencias de la salud (Afifi et al., 2014; Alsaleh, Alzaid, Abahussain, Bayoud y Lemay, 2017; Bhagavathula et al., 2016).

Como se muestra en el gráfico uno, la mayoría de los estudios de conocimientos en FCV entre profesionales de la salud, en los últimos años, han sido desarrollados en países asiáticos y en todos los casos se usaron cuestionarios validados, si bien existe una diversidad de conocimientos evaluados. Llama la atención que gran parte de los

encuestados en dichos estudios no conoce siquiera la definición correcta de FCV o de RAM. Existen insuficiencias importantes en conocimientos en FCV (Mata Maldonado et al., 2018).

### Actitudes en FCV

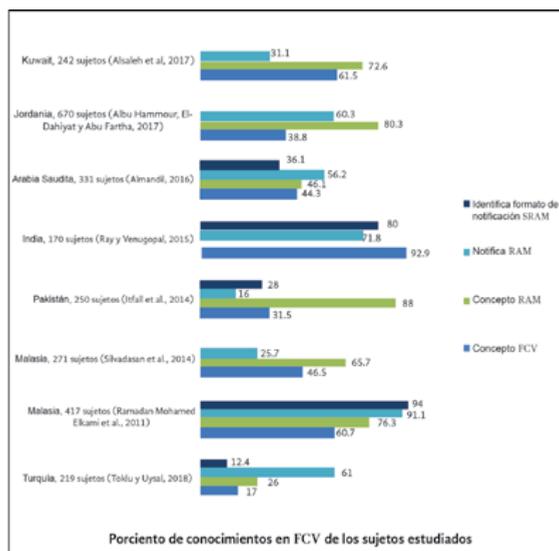
Gran variedad de investigaciones publicadas entre los años 2009 y 2017 reporta que un número elevado de profesionistas sanitarios poseen actitudes favorables hacia la FCV. Son conscientes de la trascendencia de la notificación de SRAM, sin embargo, sólo un escaso número lo hace aún habiéndolas detectado en el paciente durante la consulta médica o la estancia hospitalaria.

Si bien se han propagado programas de FCV alrededor del planeta, un grupo de profesionistas sanitarios piensa que no se obtiene ningún beneficio aparente de la notificación de SRAM, y entre quienes sí tienen el hábito de reportar las SRAM, existe la idea de sólo vigilar aquellas SRAM graves, fortuitas o excepcionales.

En el gráfico 2 se explican ciertas posturas declaradas por los participantes. Llama la atención Irán por las evaluaciones positivas de las actitudes en FCV de sus profesionales sanitarios.

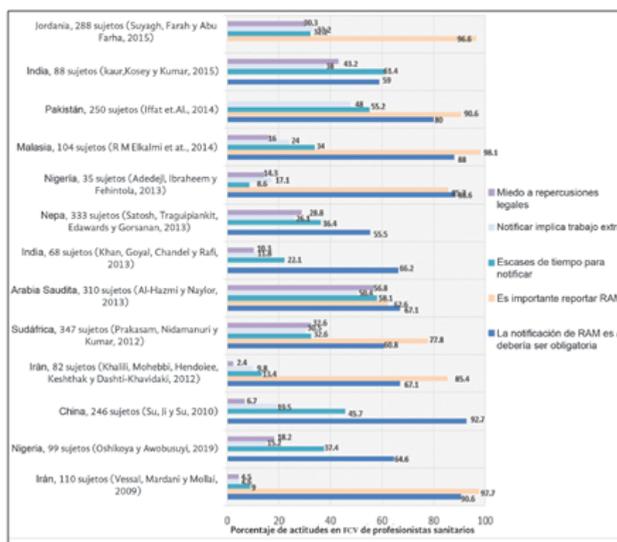
Entre los motivos que conducen a bajos índices de reporte de SRAM se pueden citar las carencias de tiempo, de retribución monetaria, de conocimiento del sitio propicio para reportar, y de divulgación e incentivación de la notificación de SRAM. A la lista anterior se suman la complejidad que implica el método de reporte, el miedo a secuelas reglamentarias y la aparente violación de la confidencialidad del paciente. En resumen, los encuestados poseen actitudes negativas de complacencia, desconocimiento letargo (Mata Maldonado et al., 2018).

**Figura 1. Porcentaje de conocimientos en FCV de profesionales de la salud en algunos estudios publicados**



Fuente: adaptado de Mata Maldonado et al., 2018.

**Figura 2. Porcentaje de actitudes en FCV de profesionales de la salud en algunos estudios publicados**

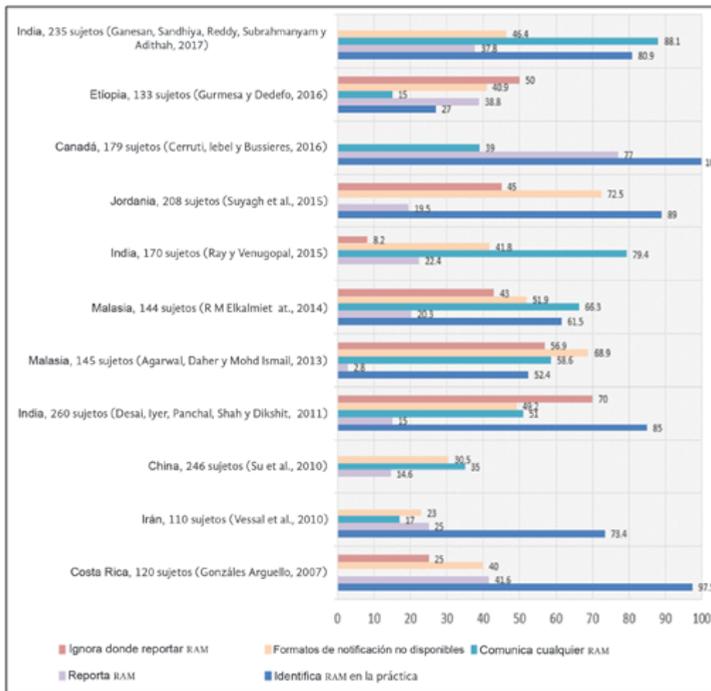


Fuentes: adaptado de Mata Maldonado et al., 2018.

### Habilidades en farmacovigilancia

Muchas veces la tarea de reportar SRAM es asignada a los farmacéuticos y en menor medida al personal de enfermería y medicina cuando la FCV debe incluir a todos los integrantes del equipo sanitario. Es evidente que no se involucra a todos los profesionales sanitarios ni a los pacientes en la detección, reporte y monitoreo de RAM (Abubakar et al., 2014; Mata Maldonado et al., 2018). Más aún, algunas publicaciones concuerdan en la necesaria participación del paciente como principal actor para un adecuado desarrollo de la FCV. En la figura 3 se da cuenta de estudios de 2007 a 2017 sobre habilidades en FCV en profesionales sanitarios.

**Figura 3. Porcentajes de habilidades en FCV y reporte de RAM de algunos estudios realizados en el mundo**



Fuentes: adaptado de Mata Maldonado et al., 2018.

La bibliografía reporta que al menos 70% de profesionistas sanitarios han identificado SRAM en sus actividades de cuidado y promoción de la salud pero dicha cifra

se reduce sustancialmente a menos del 40% que ha notificado dichas SRAM (Adedeji et al., 2013; González Argüello, 2007; Hale Zerrin Toklu Merdoğan Soyalan, Onur Gültekin, Mehmet Özpolat, Meryem Deniz Aydın, Ahmet Çayhan Günay, Dudu Özkum Yavuz, Ahmet Akici, Rümeyza Demirdamar, 2016; Perez Garcia y Figueras, 2011; Vessal et al., 2009).

También hay que tener en cuenta la facilitación de los recursos materiales y la organización adecuada del sistema de FCV puesto que, en los estudios revisados, cerca del 40% de los profesionistas sanitarios declararon que no tenían a su alcance los formatos apropiados para el reporte de SRAM y hasta un 50% ignora el sitio o a quién dirigirse para notificar (Daher, Ismail y Agarwal, 2013; Gurmessa y Dedefo, 2016; Ray y Venugopal, 2015). Sólo un minúsculo porcentaje de profesionales de la salud ha recibido formación en FCV (Karelia y Piparava, 2014; Khan et al., 2013; Reddy, Pasha, Rathinavelu, y Reddy, 2014; Stoyanova, Getov, Naseva, Lebanova, y Grigorov, 2013; Su et al., 2010; Vessal et al., 2009). Sin embargo, existe la intención de los sujetos en ser capacitados (Hanafi, Torkamandi, Hayatshahi, Gholami, y Javadi, 2012; Oshikoya y Awobusuyi, 2009; Prakasam et al., 2012; Su et al., 2010).

En resumen, es imperante aleccionar en FCV a los profesionistas sanitarios para mejorar la práctica de la FCV e incentivar el reporte de SRAM.

Las intervenciones educativas como medio de mejora de la farmacovigilancia en los profesionales de la salud

La educación sanitaria en FCV es empleada como herramienta de mejora del uso racional y seguro de los medicamentos a través del modelado de CAHFV. Por tanto, todos los profesionales sanitarios que participan de la prescripción, dispensación y administración de fármacos deberían ser capacitados continuamente (Castro Ramírez y Castro Pastrana, 2010).

Desde luego, más que una práctica punitiva o correctiva, hay que entender a la educación sanitaria desde el punto de las siete tesis de Briceño León, es decir, concebirla como una acción sanitaria, transformadora, en la cual los sujetos involucrados aportan sus conocimientos y se complementan unos a otros; debe ser además dialógica y participativa y fomentar la responsabilidad individual y la cooperación colectiva, respetando en todo momento la dignidad de la persona (Briceño León, 1996).

Diversos estudios dan soporte a la cuantía del diagnóstico de CAHFV y la puesta en marcha de intervenciones educativas para erradicar el desconocimiento en el tema y enriquece las actitudes y habilidades en FCV entre los profesionales sanitarios en beneficio de la población (Mata Maldonado et al., 2017).

Un estudio efectuado en un hospital alemán de primer nivel de atención a la salud en 38 médicos en 2009, consistió en una intervención educativa de clases teóricas y prácticas sobre FCV y reporte de RAM y evaluó el impacto de dicha intervención en el número e información de los reportes de RAM elaborados por los participantes. Luego de la intervención se observó un incremento de 148% la cantidad de reportes y del 90.7% en la calidad de los datos recogidos en dichos reportes (Tabali et al., 2009).

En un hospital de tercer nivel de la India, se realizó una intervención educativa con sesiones teórico-prácticas en 255 profesionales de la salud divididos en médicos, personal de enfermería y farmacéuticos y se midió su impacto en los conocimientos, actitudes y percepción en FCV mediante la aplicación previa y posterior de un cuestionario validado encontrándose una mejora significativa de todos los rubros evaluados (Rajesh, Vidyasagar y Varma, 2011).

En Bulgaria, se condujo una intervención educativa empleando materiales audiovisuales que fueron distribuidos a un grupo de 91 médicos en formato de CD y se midieron antes y después de dicha intervención los conocimientos y actitudes de los sujetos participantes. Por mencionar uno de los rubros evaluados, antes de la estrategia, sólo el 30.1% estaba familiarizado con el sistema de reporte de RAM y después de recibir los materiales de formación dicho porcentaje aumentó a 53%. De igual modo sucedió con el resto de los objetos evaluados (Stoynova et al., 2013).

Otro trabajo llevado a cabo en enfermeras de la ciudad de Terán, Irán, en 2010, indicó que luego de recibir educación en FCV y reporte de RAM, los conocimientos, actitudes y percepción en FCV aumentaron en gran medida y se recibieron tan sólo en el periodo de cuatro meses del estudio 26 reportes, lo cual es significativo considerando que antes de la intervención no se efectuaba ninguna notificación de RAM (Hanafi et al., 2014).

Más recientemente, en otro hospital de tercer nivel hindú, se condujo un estudio en 235 médicos y personal de enfermería, se encontró que hubo mejoría significativa en los conocimientos, actitudes y percepción de los profesionales antes y después de una intervención educativa; además el número de reportes de RAM se duplicó luego de la intervención (Ganesan et al., 2017).

En México hasta el año 2017 no existía ningún estudio relativo al diagnóstico de conocimientos, actitudes y habilidades entre profesionistas sanitarios, de ahí la relevancia y trascendencia de estudios como el llevado a cabo, el cual se expone a continuación.

Evaluación de la respuesta de un programa de adiestramiento en farmacovigilancia entre profesionales sanitarios en un hospital mexicano de segundo nivel de atención

Como objetivo general del trabajo, se evaluó el impacto de una intervención educativa (programa de adiestramiento) en los CAHFV, en el personal de medicina y enfermería de un hospital público de segundo nivel de atención del Estado de México, México.

## METODOLOGÍA

La investigación, de tipo prospectiva, fue conducida entre junio de 2016 y octubre de 2017 en un hospital público de segundo nivel de atención de la salud con especialidad en ginecología y obstetricia ubicado en el Estado de México. Los participantes se incorporaron de forma voluntaria, conformándose la muestra por 39 médicos y 61 enfermeros quienes laboraban en ese momento en el departamento de enfermería y los departamentos médicos de neonatología, anestesiología, clínica, epidemiología, educación e investigación.

### Fase 1. Diseño y pilotaje del cuestionario de evaluación de CAHFV

El estudio se efectuó en tres fases, a saber:

- a) Se determinaron las variables de CAHFV de interés a ser medidas, sus dimensiones e indicadores para enseguida redactar de acuerdo con los lineamientos para la construcción de reactivos del Centro Nacional para la Evaluación de la Educación Superior, (CENEVAL, 2013) y la taxonomía de Bloom (Bloom, Engelhart, Furst, Hill y Krathwohl, 1956) un conjunto de reactivos considerando algunos estudios

previos realizados en otros países y la normatividad mexicana aplicable (Secretaría de Salud, 2009, 2017).

- b) Se sometieron los cuestionarios a consenso de un panel multidisciplinario de ocho expertos en educación y tácticas educativas, dos en diseño de cuestionarios, tres en FCV y uno en epidemiología, adscritos a la UAEM, la Comisión para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el hospital sede del estudio (método Delphi) quienes hicieron observaciones y sugerencias a los cuestionarios, dictaminando la viabilidad de la administración de éstos.
- c) Se hizo un ensayo de administración de los cuestionarios empleando 20 profesionistas de medicina y enfermería del mismo hospital y, con base en lo observado durante el proceso de aplicación, se rediseñaron los instrumentos para modelar sus versiones definitivas.

Así, el cuestionario de habilidades y actitudes en FCV, abarca las habilidades de diagnóstico y reporte de SRAM, llenado del formato de SRAM, comunicación con el paciente, aprendizaje autónomo, trabajo colegiado e investigación. Además, se cuantificaron con apoyo de una escala de Likert de 5 puntos actitudes positivas de responsabilidad con la salud del paciente, inclinación al aprendizaje, altruismo, proactividad, disposición, colaboración y responsabilidad; también actitudes negativas de flojera, indisposición, miedo, desconocimiento, desinterés, inseguridad y desestimación.

Del mismo modo, el cuestionario de conocimientos en FCV tiene dos apartados: el primero de ellos recaba datos de los participantes como sexo, edad, profesión y si cuenta o no con especialidad y el segundo posee 19 cuestionamientos de opción múltiple con valor de un punto cada uno, para valorar las definiciones de FCV, RAM, notificación espontánea, problemas relacionados a los medicamentos (PRM), evento adverso y error de medicación; la utilidad y elementos de la FCV; la metodología y secuencia de pasos para efectuar el reporte de SRAM; y un ejemplo clínico de una RAM.

## Fase 2. Diagnóstico situacional, diseño y puesta en marcha de la intervención educativa

Se ejecutó un diagnóstico de conocimientos en FCV en los sujetos mediante autoadministración grupal de los cuestionarios antes de la intervención educativa y, de acuerdo con las áreas de oportunidad reconocidas, la normativa en FCV en turno

y la organización del hospital, se trazó y realizó un programa de adiestramiento. El programa o intervención educativa fue impartido en cuatro unidades e incluyó líneas temáticas como FCV, RAM, factores de susceptibilidad y mecanismos de producción de RAM, legislación en FCV en México y metodologías de reporte de SRAM. Cada unidad fue abordada mediante sesiones de una hora empleando como estrategias clases, conferencias, análisis grupales y un seminario de llenado de formato de SRAM de COFEPRIS.

### Fase 3. Evaluación del impacto de la intervención educativa

Luego de haber puesto en operación el programa de adiestramiento en FCV, se autoadministraron nuevamente los cuestionarios de CAHFV en los participantes y se procedió a la codificación y análisis de los datos con ayuda del software SPSS Statistics Versión 22.0.0.0. Se revisaron los puntajes del cuestionario de conocimientos en FCV de cada participante agrupándose en las categorías de bueno (13-19 puntos), regular (7-12 puntos) o deficiente (1-6 puntos); posteriormente se analizaron individualmente las respuestas correctas de los cuestionamientos valiéndose de estadística descriptiva y la prueba de Mc Nemar, reconociendo de este modo la existencia o ausencia de diferencias estadísticamente significativas con el programa de adiestramiento. Con la prueba de rangos signados de Wilcoxon se analizó el impacto del programa de adiestramiento en los conocimientos del personal de medicina y enfermería, y, de igual forma, entre ambas profesiones (U de Mann-Whitney). Usando la prueba de Chi cuadrada se buscaron probables asociaciones entre el nivel de conocimientos en FCV de los encuestados y las variables: “profesión, especialización, sexo y edad”. En todas las pruebas estadísticas un valor  $p < 0.05$  se consideró significativo. Finalmente, se empleó la moda de la frecuencia de cada respuesta según una escala de Likert de 5 puntos para las habilidades y actitudes en FCV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio tomaron parte 100 profesionistas sanitarios (61 enfermeros y 39 médicos) mediante la aplicación y respuesta de instrumentos de evaluación de CAHFV antes y posteriormente a la intervención. El 72% son mujeres, con un intervalo de edad de 20 a 40 años y únicamente 27% tiene especialidad. Los hallazgos encontrados en CAHFV de los sujetos participantes se muestran en lo sucesivo.

### Conocimientos en FCV

La calificación del instrumento de evaluación de conocimientos en FCV conseguida por los sujetos participantes progresó al recibir el adiestramiento. El promedio general para dichos profesionistas sanitarios antes del programa de adiestramiento fue de 8.93 sobre 19 puntos y de 13.70 después. Específicamente los profesionales de medicina obtuvieron un promedio de 9.56 puntos antes y de 11.25 puntos terminada la capacitación; de igual forma el personal de enfermería obtuvo 8.52 puntos antes y 15.26 después.

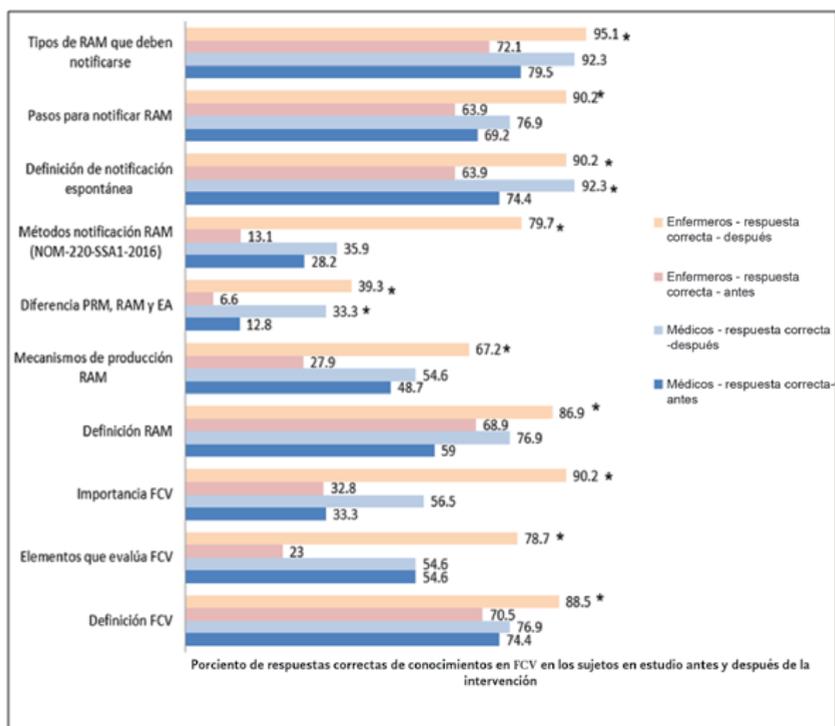
El nivel de conocimientos en FCV antes de la formación fue regular en 80% de los casos, valor que aumentó a un nivel bueno en el 58% de los participantes o conservándose en regular en 41% restante. Solamente 1% mantuvo un nivel deficiente. Asimismo, empleando la prueba de rangos signados de Wilcoxon, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) previo y posterior a la instrucción en FCV en ambos profesionales de la salud.

Se efectuó además una comparación entre los conocimientos en FCV de los enfermeros y los médicos (test de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) distinguiéndose de forma significativa el personal de enfermería por exhibir conocimientos en FCV superiores a los médicos. Los hallazgos indican que el nivel de conocimientos en FCV de los encuestados y la profesión, así como si cuentan o no con algún grado de especialización en sus respectivas carreras, están asociados significativamente entre sí (prueba de Chi cuadrada  $p < 0.05$ ) mientras que no existe asociación entre los conocimientos en FCV y el sexo o la edad.

Los porcentajes de respuestas correctas del cuestionario de conocimientos en FCV se muestran en la figura 4, tanto antes como después del adiestramiento. Por ejemplo,

con anterioridad a la formación que recibieron los médicos éstos fueron capaces de definir acertadamente a la FCV, las RAM y la notificación espontánea en un 74.4%, 79% y 74.4% según corresponde. El personal de enfermería, en contraparte, exhibió diferencias significativas en la totalidad de conocimientos en FCV evaluados *a posteriori* de la formación ( $p<0.05$ ).

Figura 4. Evaluación de los conocimientos en FCV antes y después de la intervención educativa en médicos y enfermeros



\*  $p<0.05$  Calculada por Test de Mc Nemar. FCV: farmacovigilancia, EA: Evento Adverso, RAM: Reacción Adversa a los Medicamentos, PRM: Problema Relacionado a los Medicamentos.

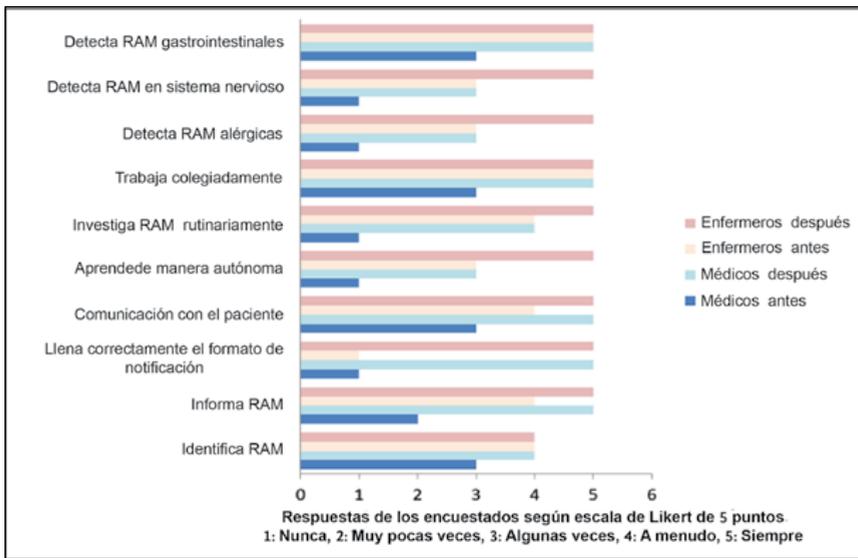
Fuente: Mata Maldonado, et al., 2017.

Como común denominador en el estudio, incrementaron significativamente ( $p<0.05$ ) todos los conocimientos del personal de enfermería, en contraparte, en los médicos, solamente hubo diferencias significativas en la definición de notificación espontánea y de la diferencia entre PRM, RAM, eventos adversos y errores de medicación (gráfico 4).

### Habilidades en FCV

Respecto a las habilidades en FCV, en la figura 5 se aprecia que éstas incrementaron después de la intervención educativa. Destacan sobre todo las habilidades de detección de RAM en sistema nervioso, de aprendizaje autónomo, de notificación de RAM y de llenado correcto del formato para tal fin.

**Figura 5. Habilidades en farmacovigilancia previas y posteriores al adiestramiento en los sujetos en estudio**

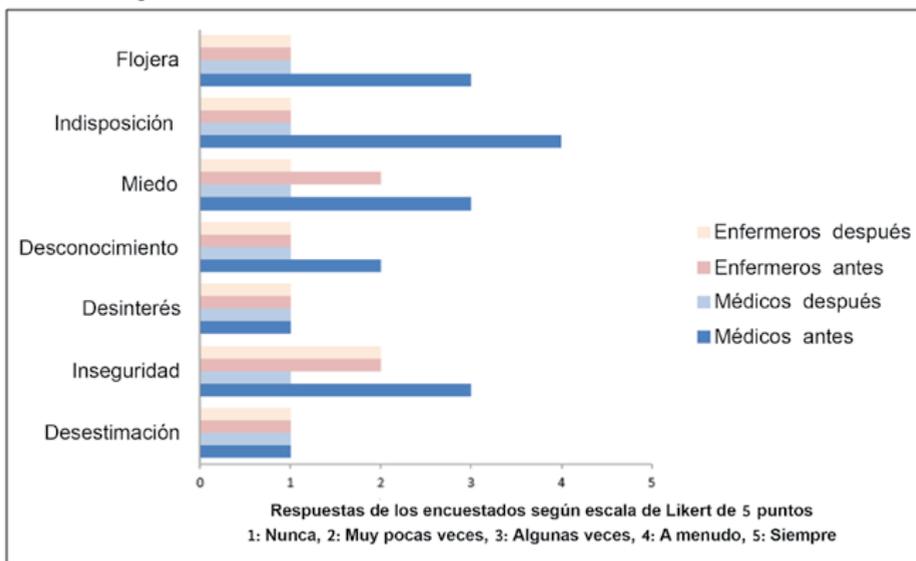


Fuente: Mata Maldonado, et al., 2017.

### Actitudes en FCV

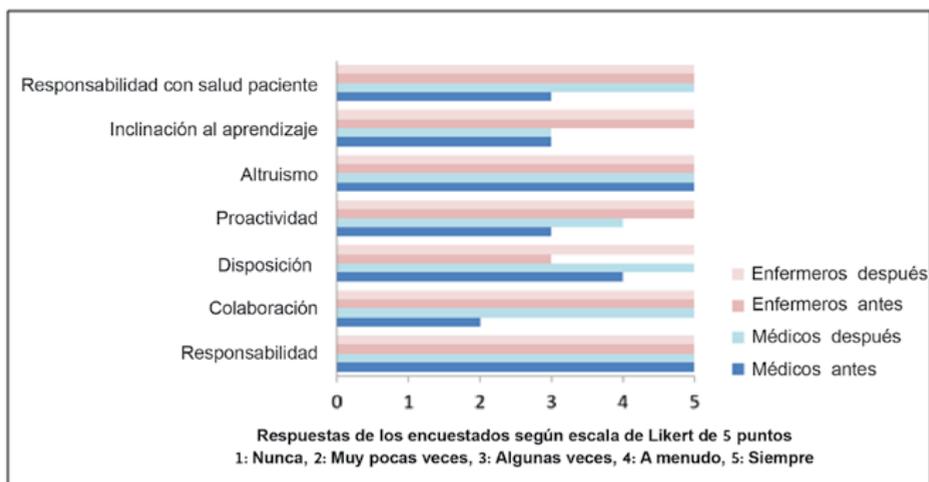
Al investigar las actitudes en FCV antes y después del adiestramiento en los sujetos estudiados se observó una clara atenuación de las actitudes negativas: de flojera, indisposición, miedo, desconocimiento e inseguridad; por el contrario, el desinterés y la desestimación permanecieron en una puntuación muy baja (figura 6). En contraste, entre el personal de medicina se elevaron la proactividad, el interés y la colaboración mientras que el resto de las actitudes positivas se sostuvieron en todos los sujetos (figura 7).

**Figura 6. Actitudes negativas en FCV previas y posteriores al adiestramiento en los sujetos en estudio**



Fuente: Mata Maldonado, et al., 2017.

**Figura 7. Actitudes positivas en FCV previas y posteriores al adiestramiento en los sujetos en estudio**



Fuente: Mata Maldonado, et al., 2017.

### *Evaluación del número y calidad de los reportes de RAM*

Como medida adicional se hizo un recuento de los reportes de SRAM y la calidad de la información contenida en éstos, antes y después de la intervención en el hospital sede del estudio. Durante los 18 meses transcurridos antes de la intervención educativa, fueron hechos únicamente seis reportes de SRAM, lo que significa un reporte cada 4.7 meses. Posterior a la intervención y durante un periodo de seis meses, se registraron ocho reportes de SRAM (o sea un promedio de al menos un reporte al mes). Por otra parte, antes del adiestramiento, dos reportes de SRAM presentan información de grado 1 y cuatro de grado 2. Después de la intervención, la mitad tienen calidad de la información grado 2 y la otra mitad grado 3 (máxima calificación otorgada a un reporte cuando contiene toda la información requerida).

Las SRAM más reportadas fueron las afecciones dermatológicas (eritema, prurito); gástricas (náusea, vómito), cardiovasculares (ritmo cardíaco elevado, tensión arterial baja) y generales (dolor de cabeza, mareo), en pacientes del sexo femenino con una edad de 18 a 36 años y ocasionadas por medicamentos empleados para el tratamiento de infecciones, del dolor y de padecimientos gástricos.

Esta es una investigación pionera en México que versa sobre la evaluación de la influencia de una intervención educativa entre el personal de medicina y enfermería en CAHFV. Dicha intervención fue fructífera pues al análisis de los resultados obtenidos se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los conocimientos en FCV antes y después de ésta en ambos profesionistas sanitarios. Los enfermeros exhibieron un mayor desempeño luego de la intervención educativa, posiblemente debido a que, por lo general, estos profesionales de la salud son más receptivos y tienen una interacción directa y más cercana con los pacientes respecto a otros profesionistas sanitarios.

Hablando de los conocimientos en FCV del personal de enfermería y medicina, se divisó que incrementaron especialmente aquellos relativos a la importancia y rubros evaluados por la FCV, así como los mecanismos de producción, proceso y métodos de notificación de RAM. Circunstancias semejantes han sido reportadas en diferentes publicaciones mundiales. Por ejemplo, Rajesh (2011) midió el porcentaje de respuestas correctas a diferentes cuestionamientos de conocimientos y se observó una diferencia significativa antes y después de una intervención educativa. Asimismo, en 2013, en la India reportaron que sólo el 7.5% de los médicos conocían el sistema de reporte de RAM: luego de la intervención, la cifra aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) al 92.5% (Sanghavi, Dhande y Pandit, 2013).

Si bien en la última década se ha logrado la inclusión de la FCV en las algunas universidades, se nota que existe un bajo nivel de conocimientos en ese rubro incluso en profesionistas jóvenes. Por lo que los esfuerzos aún son insuficientes y se debe hacer especial énfasis en el personal de enfermería, medicina y farmacia.

En cuanto a las habilidades en FCV, los profesionistas sanitarios declararon sentirse más capaces de desempeñarse correctamente en su práctica diaria pues después de la formación que recibieron en la materia incrementaron sus habilidades en dos, tres o hasta cuatro puntos según la escala de Likert manejada. Merece especial atención el aumento de las habilidades de notificación de RAM y de llenado correcto del formato de SRAM de la COFEPRIS, puesto que en dicha intervención se hizo especial énfasis en esos rubros para incentivar el reporte de RAM toda vez que se implementaron actividades como el taller de llenado del formato de notificación de SRAM.

Las investigaciones previas sobre actitudes en FCV reportadas en la bibliografía, son en gran parte heterogéneas entre sí en cuestiones metodológicas, pero todas coinciden en que los profesionistas sanitarios en general tienen actitudes negativas ante la FCV. Caso contrario es este estudio pues exceptuando la actitud de inseguridad se abatieron totalmente las actitudes negativas en FCV luego de la intervención (Abubakar et al., 2014; Acuña Ferradanes et al., 2012; dos Santos Pernas, Herdeiro, Lopez Gonzalez, da Cruz e Silva y Figueiras, 2012; Mata Maldonado et al., 2018).

Se refuerza el éxito de la intervención al apreciar la cantidad y calidad de los reportes de SRAM efectuados antes y después. Sin embargo, considerando que el hospital sede del estudio cuenta con 119 camas censables y 80 no censables, así como una cobertura de 6276 consultas por mes y 10 6680 asegurados permanentes, la cifra no es satisfactoria, en tanto que no cumple con los indicadores de FCV del Modelo Nacional de Farmacia Hospitalaria y del documento “Hacia una política farmacéutica integral para México” (Secretaría de Salud, 2005, 2009).

Respecto al sexo de las pacientes que manifestaron una RAM, se atribuye al tipo de hospital y es consistente con la predisposición naturalmente observada de padecer RAM a razón de 2:1 respecto a los hombres (Laporte y Capellá, 1995).

Debido a que una intervención educativa se realiza durante un tiempo limitado y a menudo corto, es preciso apuntar que deben llevarse a cabo programas de formación continua en FCV que estimulen el reporte de SRAM, ya que estos resultados pueden variar y disminuir nuevamente la calidad y cantidad de los reportes de SRAM.

## CONCLUSIÓN

De la revisión del estado del arte sobre los estudios publicados en el mundo de conocimientos, percepción y actitudes de los profesionales de la salud con relación a la FCV se concluye que es de vital importancia el diagnóstico de su situación para desarrollar e implementar tácticas encaminadas al progreso de la práctica de la FCV.

Derivado del análisis de los resultados obtenidos en el estudio realizado, se obtienen las siguientes conclusiones:

- La intervención educativa efectuada mejoró los CAHFV, así como la notificación de SRAM entre los profesionales de la salud, en concordancia con otros estudios.
- La profesión sanitaria está ligada a la disposición para hacer FCV puesto que, en el estudio llevado a cabo, el personal de enfermería tuvo un mayor incremento de conocimientos en FCV respecto a los médicos.
- En todas las habilidades en FCV que se midieron en campo hubo un incremento notable en la puntuación de la escala de Likert tanto en médicos como en el personal de enfermería.
- La puntuación de las actitudes positivas en FCV se acrecentó sobre todo en el caso de los médicos y se mantuvo alta entre el personal de enfermería.
- Si bien, al inicio del estudio y, en especial los médicos, presentaban actitudes negativas hacia la FCV, luego de la intervención dichas actitudes desaparecieron toda vez que se les sensibilizó en la importancia de la FCV para coadyuvar en la seguridad de la farmacoterapia y mostró que el reporte de SRAM es proceso sencillo de ejecutar.
- Derivado de la intervención educativa efectuada, la cantidad y calidad de los reportes de SRAM incrementaron, si bien aún no son suficientes de acuerdo con el número de pacientes que son atendidos en dicho hospital. Lo anterior hace ver la necesidad de reforzar la educación en FCV e incluirla como parte de las actividades de formación continua del hospital.

De estas conclusiones, derivan las siguientes recomendaciones aplicables a nuestro país. Es deseable involucrar a los organismos regulares en el fomento de la FCV, por ejemplo, apoyando la obligatoriedad legal del reporte entre profesionistas sanitarios; eliminando la burocracia en el proceso; descentralizando el sistema de FCV y refinando el enlace entre los actores de la FCV.

En resumen, es necesario impulsar la notificación de SRAM entre los profesionales de salud, pacientes e industrias farmacéuticas, mediante una formación continua que afiance los CAHFV.

En México, los estudios en FCV son prácticamente inexistentes; por tanto, es primordial acrecentarlos para sustentar políticas de operación de la FCV impactando positivamente en la calidad, fiabilidad y eficiencia de la terapia farmacológica.

## REFERENCIAS

- Abu Hammour, K., El-Dahiyat, F. y Abu Farha, R., 2017. Health care professionals knowledge and perception of pharmacovigilance in a tertiary care teaching hospital in Amman, Jordan. *Journal of Evaluation in Clinical Practice* [en línea], 23 (3), 608-613. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jep.12683>
- Abubakar, A. R., Simbak, N. Bin, y Haque, M., 2014. A systematic review of knowledge, attitude and practice on adverse drug reactions and pharmacovigilance among doctors. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [en línea], 4(10), 117-127. Disponible en: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40121>
- Acuña Ferradanes, A., González Añón, D., Castillo Páramo, A., Fornos Pérez, J. A., Andrés Iglesias, J. C. y Andrés Rodríguez, N. F., 2012. Metodología para evaluar las actitudes y aptitudes sobre farmacovigilancia en los farmacéuticos comunitarios. Aplicación en la provincia de Pontevedra. *Pharmaceutical Care Espana*, 14 (3), 110-121.
- Adedeji, W. A., Ibraheem, W. A. y Fehintola, F. A., 2013. Attitude and Practice of Doctors Toward Adverse Drug Reactions (ADRs) Reporting in a Nigerian Tertiary Health Facility. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine* [en línea], 11 (2), 77-80. Disponible en: <https://doi.org/10.14744/nci.2014.41636>
- Afifi, S., Maharloui, N., Peymani, P., Namazi, S., Gharaei, A. G., Jahani, P. y Lankarani, K. B., 2014. Adverse drug reactions reporting: pharmacists' knowledge, attitude and practice in Shiraz, Iran. *Int J Risk Saf Med* [en línea], 26 (3), 139-145. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/jrs-140620>
- Agarwal, R., Daher, A. M, y Mohd Ismail, N., 2013. Knowledge, practices and attitudes towards adverse drug reaction reporting by private practitioners from Klang valley in Malaysia. *Malays J Med Sci*, 20 (2), 52-61.

- Al-Hazmi, N. N. I., y Naylor, I. L., 2013. Attitude and awareness of adverse drug reaction reporting by health professionals in seven hospitals in the Holy City of Makkah, Kingdom of Saudi Arabia. *J. Clin. Trials*, 3.
- Almandil, N. B., 2016. Healthcare professionals' awareness and knowledge of adverse drug reactions and pharmacovigilance. *Saudi Med J* [en línea], 37(12), 1359-1364. Disponible en: <https://doi.org/10.15537/smj.2016.12.17059>
- Alsaleh, F. M., Alzaid, S. W., Abahussain, E. A., Bayoud, T. y Lemay, J., 2017. Knowledge, attitude and practices of pharmacovigilance and adverse drug reaction reporting among pharmacists working in secondary and tertiary governmental hospitals in Kuwait. *Saudi Pharm J* [en línea], 25 (6), 830-837. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.004>
- Bhagavathula, A. S., Elnour, A. A., Jamshed, S. Q. y Shehab, A. (2016). Health Professionals' Knowledge, Attitudes and Practices about Pharmacovigilance in India: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* [en línea], 11 (3), e0152221. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152221>
- Bloom, S., Engelhart, M., Furst, E., Hill, W. y Krathwohl, D., 1956. *Taxonomy of educational objectives: the classification of educational goals: handbook I: cognitive domain*. New York, U.S.
- Briceño Leon, R., 1996. *Siete tesis sobre la educación sanitaria para la participación comunitaria*. Cad Saude Publ.
- Castro-Ramírez, V. R. y Castro Pastrana, L., 2010. El papel de la educación sanitaria en la farmacovigilancia. In L. M. Gómez- Oliván y L. I. Castro Pastrana. *Farmacovigilancia en México: de la teoría a la práctica* (155–172). México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- CENEVAL, 2013. *Lineamientos para la construcción de reactivos de opción múltiple*. México.
- Cerruti, L., Lebel, D. y Bussieres, J. F., 2016. Hospital pharmacists' perception of pharmacovigilance in Quebec. *Ann Pharm Fr* [en línea], 74 (2), 137-145. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.07.001>
- Daher, A. M., Ismail, N. M. y Agarwal, R., 2013. Knowledge, practices and attitudes towards adverse drug reaction reporting by private practitioners from Klang valley in Malaysia. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 20 (2), 53-62.
- Desai, C. K., Iyer, G., Panchal, J., Shah, S. y Dikshit, R. K., 2011. An evaluation of knowledge, attitude, and practice of adverse drug reaction reporting among prescribers at a tertiary care hospital. *Perspectives in Clinical Research*, 2 (4), 129.

- Dos Santos Pernas, S. I., Herdeiro, M. T., Lopez Gonzalez, E., Da Cruz e Silva, O. A. B. y Figueiras, A., 2012. Attitudes of Portuguese health professionals toward adverse drug reaction reporting. *International Journal of Clinical Pharmacy* [en línea], 34 (5), 693-698. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11096-012-9675-6>
- Elkalmi, R. M., Hassali, M. A., Ibrahim, M. I., Jamshed, S. Q., y Al-Lela, O. Q. (2014). Community pharmacists' attitudes, perceptions, and barriers toward adverse drug reaction reporting in Malaysia: a quantitative insight. *J Patient Saf* [en línea], 10 (2), 81-87. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/pts.0000000000000051>
- Elkalmi, R. M., Hassali, M. A., Ibrahim, M. I. M., Widodo, R. T., Efan, Q. M. A., y Hadi, M. A., 2011. Pharmacy students' Knowledge and perceptions about pharmacovigilance in Malaysian public universities. *American Journal of Pharmaceutical Education* [en línea], 75 (5). Disponible en: <https://doi.org/10.5688/ajpe75596>
- Ganesan, S., Sandhiya, S., Reddy, K. C., Subrahmanyam, D. K. y Adithan, C., 2017. The Impact of the Educational Intervention on Knowledge, Attitude, and Practice of Pharmacovigilance toward Adverse Drug Reactions Reporting among Health-care Professionals in a Tertiary Care Hospital in South India. *J Nat Sci Biol Med* [en línea], 8 (2), 203-209. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0976-9668.210014>
- Gómez-Oliván, L. M., Téllez, A. M., y López, M., 2005. Importancia de establecer programas de farmacovigilancia en los hospitales mexicanos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36, 41-48.
- González Argüello, R., 2007. Farmacovigilancia en Costa Rica; la percepción del personal médico. *Revista Médica de La Universidad de Costa Rica Vol. 1 Núm. 2007*.
- Gurmesa, L. T. y Dedefo, M. G., 2016. Factors Affecting Adverse Drug Reaction Reporting of Healthcare Professionals and Their Knowledge, Attitude, and Practice towards ADR Reporting in Nekemte Town, West Ethiopia. *Biomed Res Int* [en línea], 2016, 5728462. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2016/5728462>
- Gutiérrez Mendoza, L. M., Torres Montes, A., Soria Orozco, M., Padrón Salas, A. y Ramírez Hernández, M. E., 2015. Costos de eventos adversos graves en un Hospital Comunitario de Enseñanza en México. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)* [en línea], 83(3), 211-216. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.013>
- Hale Zerrin Toklu Mertdoan Soyalan, Onur Gültekin, Mehmet Özpölat, Meryem Deniz Aydın, Ahmet Çayhan Günay, Dudu Özkum Yavuz, Ahmet Akici4 , Rümeyza Demirdamar, 2016. The Knowledge and Attitude of the Healthcare Professionals towards Pharmacovigilance and Adverse Drug Reaction Reporting in Northern

- Cyprus. *Pharmacovigilance* [en línea], 4(1), 1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.4172/23296887.1000193>
- Hanafi, S., Torkamandi, H., Hayatshahi, A., Gholami, K. y Javadi, M., 2012. Knowledge, attitudes and practice of nurse regarding adverse drug reaction reporting. *Iran J Nurs Midwifery Res* [en línea], 17 (1), 21-25. En línea: <https://doi.org/10.7860/jcdr/2012/4883.2680>
- Hanafi, S., Torkamandi, H., Hayatshahi, A., Gholami, K., Shahmirzadi, N. y Javadi, M., 2014. An educational intervention to improve nurses' knowledge, attitude, and practice toward reporting of adverse drug reactions. *Iran J Nurs Midwifery Res*, 19, 101-106.
- Iffat, W., Shakeel, S., Rahim, N., Anjum, F., Nesar, S. y Ghayas, S., 2014. Pakistani physicians knowledge and attitude towards reporting adverse drug reactions. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8 (14), 379-385.
- Karelia, B. N. y Piparava, K. G., 2014. Knowledge, attitude and practice of pharmacovigilance among private healthcare professionals of Rajkot city.
- Kaur, M., Kosey, S. y Kumar, R., 2015. Knowledge, attitude, and practice of healthcare professionals about adverse drug reaction in major tertiary care teaching hospital in Punjab, 4 (5), 993-998.
- Khalili, H., Mohebbi, N., Hendoiee, N., Keshtkar, A. A. y Dashti Khavidaki, S. (2012). Improvement of knowledge, attitude and perception of healthcare workers about ADR, a pre-and post-clinical pharmacists' interventional study. *BMJ Open*, 2 (1), e000367.
- Khan, S. A., Goyal, C., Chandel, N. y Rafi, M., 2013. Knowledge, attitudes, and practice of doctors to adverse drug reaction reporting in a teaching hospital in India: An observational study. *J Nat Sci Biol Med* [en línea], 4 (1), 191-196. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0976-9668.107289>
- Laporte, J. R. y Capellá, D. (1995). Mecanismos de producción y diagnóstico clínico de los efectos indeseables producidos por los medicamentos. *Principios de Epidemiología Del Medicamento*, 95-109.
- Mata Maldonado, J., 2017. *Diagnóstico de conocimientos, actitudes y habilidades y evaluación de un programa piloto de capacitación en farmacovigilancia a profesionales de la salud en el H.G.O. No. 221 Dr. Emilio Chuayffet Chuayffet del IMSS. Tesis de maestría*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Mata Maldonado, J., Ortiz Reynoso, M., y Islas Flores, H., 2018. Revisión sistemática sobre los conocimientos, la percepción y las actitudes de los profesionales de la salud en farmacovigilancia (Aceptado para su publicación). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 49 (1).

- Mata Maldonado, J., Ortiz Reynoso, M., Islas Flores, H., Díaz Flores, M., De León Camacho, V., y Tenorio Vieyra, L. E., 2017. Impacto de una intervención educativa en los conocimientos en farmacovigilancia y en el reporte de reacciones adversas a los medicamentos de profesionales de la salud en un hospital público de segundo nivel de atención en el Estado de México, México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 48 (4), 78-89.
- Oshikoya, K. A., y Awobusuyi, J. O., 2009. Perceptions of doctors to adverse drug reaction reporting in a teaching hospital in Lagos, Nigeria. *BMC Clin Pharmacol* [en línea], 9 (14). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1472-6904-9-14>
- Perez Garcia, M. y Figueras, A., 2011. The lack of knowledge about the voluntary reporting system of adverse drug reactions as a major cause of underreporting: direct survey among health professionals. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 20(12), 1295-1302. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/pds.2193>
- Prakasam, A., Nidamanuri, A., y Kumar, S., 2012. Knowledge, perception and practice of pharmacovigilance among community pharmacists in South India. *Pharmacy Practice* [en línea], 10 (4), 222-226. Disponible en: <https://doi.org/10.4321/S1886-36552012000400006>
- Rajesh, R., Vidyasagar, S., y Varma, D. M., 2011. An educational intervention to assess knowledge attitude practice of pharmacovigilance among health care professionals in an Indian tertiary care teaching hospital. *International Journal of PharmaTech Research*, 3 (2), 678-692.
- Ray, D., y Venugopal, A., 2015. An Evaluation of Knowledge, Attitude and Practice of Pharmacovigilance amongst the Prescribers of a Medical College Hospital in North Eastern State of India: A cross Sectional Study. *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2 (4), 183-190.
- Reddy, V. L., Pasha, S. K. J., Rathinavelu, M., y Reddy, Y. P., 2014. Assessment of knowledge, attitude and perception of pharmacovigilance and adverse drug reaction (ADR) reporting among the pharmacy students in south India. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 9(2), 34-43.
- Rodríguez-Carranza, R., Vidrio, H., y Campos-Sepúlveda, E., 2008. La enseñanza de la farmacología en las escuelas de medicina. Situación actual y perspectivas. *Gac Med Mex*, 144 (6), 463-472.
- Rosete Reyes, A., 2011. Farmacovigilancia en instituciones de salud. *Rev Invest Med Sur Mex* [en línea], 18 (3), 102-110. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2011/ms113b.pdf>

- Salas Rojas, S. G., Pérez Morales, M. E., Meléndez López, S. G. y Castro Pastrana, L. I., 2012. Reacciones adversas a medicamentos relacionadas con ingresos y estancias hospitalarias: Revisión sistemática de 2000-2011. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43 (3), 19-35.
- Sanghavi, D. R., Dhande, P. P. y Pandit, V. A., 2013. Perception of pharmacovigilance among doctors in a tertiary care hospital: influence of an interventional lecture. *Int J Risk Saf Med*, 25 (4), 197-204. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/jrs-130598>
- Santosh, K., Tragulpiankit, P., Edwards, I. R., y Gorsanan, S., 2013. Knowledge about adverse drug reactions reporting among healthcare professionals in Nepal. *International Journal of Risk and Safety in Medicine*, 25(1), 1-16. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JRS-120578>
- Secretaría de Salud. Hacia una política farmacéutica integral para México, 2005. México.
- Secretaría de Salud. Modelo Nacional de Farmacia Hospitalaria, 2009. México.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y operación de la Farmacovigilancia, 2017. México.
- Sivadasan, S., Chyi, N. W., Ching, A. L., Ali, A. N., Veerasamy, R., Marimuthub, K. y Arumugama, D. S., 2014. Knowledge and perception towards pharmacovigilance and adverse drug reaction reporting among medicine and pharmacy students. *WJPPS*, 3 (3), 1652–1676.
- Stoynova, V., Getov, I. N., Naseva, E. K., Lebanova, H. V. y Grigorov, E. E. (2013). Physicians' knowledge and attitude towards adverse event reporting system and result to intervention--randomized nested trial among Bulgarian physicians. *Medicinski Glasnik : Official Publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*, 10 (2), 365-372.
- Su, C., Ji, H. y Su, Y. (2010). Hospital pharmacists' knowledge and opinions regarding adverse drug reaction reporting in Northern China. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* [en línea], 19 (3), 217-222. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/pds.1792>
- Suyagh, M., Farah, D. y Abu Farha, R., 2015. Pharmacist's knowledge, practice and attitudes toward pharmacovigilance and adverse drug reactions reporting process. *Saudi Pharm J*, 23 (2), 147-153. En línea: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.07.001>
- Tabali, M., Jeschke, E., Bockelbrink, A., Witt, C. M., Willich, S. N., Ostermann, T. y Matthes, H., 2009. Educational intervention to improve physician reporting of adverse drug reactions (ADRs) in a primary care setting in complementary and alternative medicine. *BMC Public Health* [en línea], 9, 1-11. Disponible e: <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-274>

- Toklu, H. Z. y Uysal, M. K., 2008. The knowledge and attitude of the Turkish community pharmacists toward pharmacovigilance in the Kadikoy district of Istanbul. *Pharmacy World and Science* [en línea], 30 (5), 556-562. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11096-008-9209-4>
- Vessal, G., Mardani, Z. y Mollai, M., 2009. Knowledge, attitudes, and perceptions of pharmacists to adverse drug reaction reporting in Iran. *Pharm World Sci* [en línea], 31 (2), 183-187. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11096-008-9276-6>
- World Health Organization, 2002. The World Health Organization Programme for International Drug Monitoring. The importance of Pharmacovigilance. Disponible en: <https://www.who-umc.org>

# KETAMINA, USOS CLÍNICOS EN HUMANOS

*Mario Ángel Rosas Sánchez*<sup>1</sup>

*Ma. Victoria Domínguez García*<sup>2</sup>

*Miriam V. Flores Merino*<sup>2</sup>

La ketamina es un fármaco aprobado para su utilización con fines anestésicos, sin embargo, dados sus múltiples efectos en distintos órganos y sistemas, ha sido utilizada para sedo-analgésia, como adyuvante en el control del dolor postoperatorio y crónico, el estatus epiléptico refractario, el delirium posoperatorio, entre otras indicaciones.

El mecanismo de acción mejor conocido es el bloqueo de receptores N-metil de aspartato, aunque se sugiere su influencia en otros sistemas de neurotransmisores y vías de señalización, que le confieren distintas propiedades y una amplia gama de efectos clínicos relevantes. Aunque nuevos fármacos han desplazado a la ketamina como el anestésico de primera elección, se continúa utilizando en situaciones clínicas muy particulares y sigue surgiendo evidencia de su efectividad, en el manejo de algunas patologías fuera del contexto anestésico, cuando éstas son refractarias al tratamiento de primera línea.

El objetivo del presente capítulo, es hacer una revisión cualitativa de los aspectos farmacológicos más destacados de la ketamina y describir los usos clínicos de este fármaco en seres humanos.

## INTRODUCCIÓN

La ketamina es un anestésico intravenoso, que se diferencia de otros por su capacidad de generar un estado disociativo y producir analgesia. Estas propiedades, han extendido sus aplicaciones clínicas al tratamiento adyuvante del dolor agudo y crónico (López Millán et al., 2007). Entre otras aplicaciones se encuentran: el tratamiento

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Ciencias Médicas

\* mariorosas82@gmail.com.

para la depresión persistente, la sedo-analgésia en pacientes críticamente enfermos, el control de crisis convulsivas refractarias a otros medicamentos (Eldufani et al., 2018) e incluso el tratamiento de adicciones a drogas de abuso (Ezquerro Romano et al., 2018).

Aunque el antagonismo de receptores n-metil-d-aspartato, es el principal mecanismo de acción de la ketamina (Neyra y Orteja, 2004), se describen interacciones complejas en vías aminérgicas (serotonina y noradrenalina), la inhibición de la óxido nítrico sintasa, un efecto directo sobre receptores opioides delta y mu, receptores colinérgicos y de glutamato, etc., que le confieren una amplia gama de efectos clínicos, entre ellos, analgesia, hipnosis, broncodilatación, anestesia disociativa, taquicardia, hipertensión, alucinaciones (Sleigh, Harvey et al., 2014) y experiencias psicodélicas. Este último efecto, ha sido la causa de que la ketamina sea consumida como una droga de abuso y por otro lado, ha mermado la frecuencia en la que los profesionales de la salud, hacen uso de este fármaco en su práctica cotidiana (Royo Isach et al., 2004).

Por lo anterior, el objetivo de éste capítulo es describir los principales aspectos farmacológicos, las ventajas y desventajas del uso clínico de la ketamina en humanos.

### Farmacodinamia de la ketamina

La ketamina fue sintetizada y aprobada como un fármaco intravenoso derivado de la fenciclidina, para su uso como anestésico disociativo desde 1970 (Álvarez Ríos et al., 2004). Su nombre químico es clorhidrato de 2-(o-clorofenilo)-2-(metilamino) ciclohexanona (Marchesini et al., 2004), tiene un peso molecular de 238 g/mol, un pKa de 7.5, parcialmente hidrosoluble y altamente liposoluble. Se comercializa como una solución ácida (pH 3.5-5.5) de cloruro de sodio y cloruro de benzalconio como conservador, que contiene una mezcla racémica de sus enantiómeros ópticos: R (+) y S (-), de los cuales, éste último es 3 a 4 veces más potente que su enantiómero dextrógiro (Álvarez Ríos et al., 2004).

Los efectos clínicos de la ketamina, se deben principalmente a su interacción farmacológica con receptores NMDA en el sistema nervioso central, los cuales, son complejos proteicos tetraméricos, compuestos por 2 subunidades NR1 y 2 subunidades NR2, que forman un canal iónico (Peltoniemi et al., 2016) y permite la entrada de calcio y sodio a la neurona y facilitan la salida de potasio al espacio extracelular (MacDonald et al., 1897).

En condiciones normales, el dominio extracelular del receptor NMDA se encuentra bloqueado por ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ), sin embargo cambios ligeros en el potencial de membrana neuronal (derivados de estímulos neuronales indirectos), disminuyen la afinidad del  $Mg^{2+}$  por el receptor, hasta disociarse del mismo (MacDonald et al., 1987), permitiendo así la disponibilidad del dominio extracelular, para la unión simultánea de los ligandos glutamato y glicina (coagonistas) con el receptor NMDA y su consecuente activación y apertura (Flores Soto et al., 2012; Islas et al., 2017).

La naturaleza ionotrópica despolarizante del receptor NMDA, favorece funciones excitadoras del sistema nervioso central (SNC), desencadenando una serie de procesos fisiológicos que influyen en la memoria, el aprendizaje, el estado anímico, la percepción del dolor, el desarrollo de plasticidad neural, el inicio y el mantenimiento de la sensibilización central asociada a un daño o inflamación de tejidos periféricos (Flores Soto et al., 2004), entre otros procesos.

Como se ha mencionado, el principal mecanismo de acción de la ketamina es el bloqueo no competitivo del receptor NMDA (Islas et al., 2017), de acuerdo a estudios electroencefalográficos, el bloqueo es altamente selectivo e intenso en regiones específicas del SNC como el hipocampo, tálamo y sistema límbico (Reich et al., 1989), la actividad epileptiforme derivada del bloqueo del receptor NMDA en éstas áreas, sugiere la teoría de una desincronización suficiente en áreas emocionales, para producir el estado anestésico disociativo característico de la ketamina, un estado mental en el que pareciera que los sujetos no se encuentran dormidos, ni anestesiados, sino más bien disociados de su entorno (Domino et al., 1965). Otra teoría (Kayama et al., 1972) sugiere que la actividad electroconvulsiva registrada en el electroencefalograma (EEG) de pacientes anestesiados con ketamina, supone que la pérdida de la conciencia es similar a la que experimentan los pacientes con epilepsia de tipo pequeño mal, pues el trazo electroencefalográfico es muy similar en ambos casos. Hasta este punto, un solo mecanismo de acción resulta insuficiente para explicar todos los efectos clínicos de la ketamina, lo que alentó el interés de los investigadores por indagar otras interacciones de éste fármaco en el SNC.

Actualmente, se describe también que la ketamina actúa como un agonista parcial de receptores opioides  $\mu$ , que explica en parte la sensación de confort, el efecto analgésico y la sedación; a la par, se especifica un agonismo de receptores  $\sigma$ , los cuales están asociados a la presencia de alucinaciones, aparición de actividad

electroconvulsiva, disminución y desensibilización del dolor crónico (Rosenbaum et al., 2018).

Otros mecanismos descritos por Sleight incluyen interacciones no bien dilucidadas de la ketamina con receptores y neurotransmisores del sistema nervioso central, entre ellos, la modulación de receptores NMDA no dependientes de glutamato, denominados AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metilisoaxazol-4-ácido propiónico, por sus siglas en inglés), una modulación del sistema colinérgico, el aumento de la liberación de noradrenalina y dopamina, el bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y la modulación en la liberación de óxido nítrico (ON) y glutamato.

Bellauro describe un efecto relevante de la ketamina a nivel genético neuronal, que se puede asociar con la disminución de los síntomas presentes en modelos de dolor neuropático. Al respecto, refiere que la ketamina suprime la expresión temprana de los genes: *zif / 268*, *c-fos*, *junB*, *fosB*, *c-jun*, *junD*, los cuales están relacionados con lesiones mecánicas en tejido nervioso. Teóricamente, estos genes se expresan ante la influencia de neurotransmisores liberados en tejido neural, después de una lesión traumática; el glutamato, es uno de los neurotransmisores implicados en ésta expresión genética y por ende, el bloqueo de la entrada intraneuronal del mismo, por acción de la ketamina, frena la expresión de los genes mencionados, modulando así el dolor neuropático secundario a lesiones nerviosas.

La ketamina también limita la activación astrocítica y microglial, en situaciones de trauma y enfermedades neurodegenerativas, a través de un decremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (PAFG) (Sleight et al., 2014). En condiciones normales, las lesiones traumáticas o degenerativas del SNC, se inducen la formación de PAFG para activar a los astrocitos, los cuales, son células de sostén en el SNC y cuya activación puede conducir a una reorganización tisular duradera, que puede culminar hasta un tipo de fibrosis llamada cicatriz glial; este tipo de fibrosis, inhibe la regeneración axonal y protege a la neurona frente a la llegada de células inflamatorias y agentes infecciosos (Guillamón Vivancos et al., 2015). El uso de la ketamina en trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, puede sustentarse en parte, por la limitación de la fibrosis que por el mecanismo descrito (Eldufani et al., 2018).

Los mecanismos de acción de la ketamina, no se limitan al SNC como inicialmente se pensaba, Hill, sugiere que a nivel periférico, la ketamina puede disminuir la respuesta inflamatoria en pacientes con sepsis e infecciones graves. En un contexto infeccioso, se produce una disminución de la función de la enzima adenililciclase y en

consecuencia del adenosín monofosfato cíclico (cAMP) a nivel celular, esto produce un aumento en la síntesis y liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\Omega$ ), ambas, citosinas proinflamatorias implicadas en el deterioro del funcionamiento corporal en general. Además, la disminución del cAMP en células dependientes del sistema beta-adrenérgico, provoca una caída del gasto cardíaco y el empeoramiento de las condiciones generales de pacientes con sepsis e infecciones graves. En este escenario, la ketamina limita la disminución del cAMP, modulando el deterioro en la funcionalidad de la adenililciclase, con la subsecuente mejoría en la función cardiovascular y la disminución de la respuesta inflamatoria sistémica mediada por TNF- $\alpha$  y IFN- $\Omega$ . Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se produce este efecto antiinflamatorio de la ketamina, aún no son bien comprendidos.

Todos estos mecanismos bioquímicos, se conducen de forma sincrónica e interactúan conjuntamente, para originar una amplia gama de efectos clínicos benéficos y adversos en el ser humano, siendo difícil aislar los efectos por separado de cada mecanismo de acción.

### Farmacocinética de la ketamina

La vía de administración más utilizada para la ketamina es la intravenosa (IV), seguida de la vía oral (VO) e intramuscular (IM) y menos frecuentes son las vías nasal (NS), subcutánea (SC), sublingual (SL), transrectal (TR), entre otras (Katzung et al., 2013). La elección de la vía a utilizar obedece al objetivo terapéutico y la preferencia del profesional en salud, puntos que se describirán en apartados posteriores.

Debido a que la ketamina es un anestésico intravenoso, se comenzará con la descripción clásica de sus parámetros farmacocinéticos, calculados después de la administración de un bolo intravenoso de 1-2 mg/kg/IV (Katzung et al., 2013). El rápido inicio de efecto de la ketamina, está determinado por su alta liposolubilidad y distribución en el SNC, de ahí que su vida media  $\alpha$  sea de 2 a 4 min. La distribución de la ketamina a tejidos bien perfundidos condiciona una vida media corta. Este hecho es consistente con un modelo de distribución bicompartimental, ya que el fármaco no se acumula en tejidos escasamente perfundidos (Peltoniemi et al., 2016). El término de su efecto oscila alrededor de 10 minutos posteriores a su administración

en el torrente sanguíneo (Katzung et al., 2013). En este modelo bicompartimental de distribución de la ketamina, se describe una media  $\beta$  de 2 a 4 h, un volumen de distribución en estado estable de 160-550 L/70 kg (Peltoniemi et al., 2016), una vida media de distribución de 24.1seg, una vida media de redistribución de 4.7min, un volumen de distribución  $V_d = 3.1$  L/kg, tiempo medio ( $t_{1/2}$ ) de distribución = 11-16 min y una escasa unión a proteínas (12%), esto último, garantiza una alta fracción libre del fármaco en plasma (Katzung et al., 2013). Por lo que es necesario el ajuste de la dosis en pacientes con hipoproteinemia, aunque la variabilidad biológica de cada sujeto (por ejemplo: metabolismo, polimorfismos genéticos, etc.) permite variaciones en el comportamiento farmacocinético de la ketamina y por tanto de sus efectos en la práctica clínica.

La ketamina se metaboliza en el hígado, mediante N-desmetilación, por el sistema del citocromo P450, los metabolitos derivados de este proceso son la norketamina (80% de la ketamina es N-desmetilada a norketamina), la 4-hidroxi-ketamina y la 6-hidroxi-ketamina (Peltoniemi et al., 2016). De estos, destaca la norketamina, que es una forma activa de la ketamina, pero 3 a 5 veces menos potente que esta última (Álvarez Ríos et al., 2004). Una disminución del flujo sanguíneo hepático o la presencia de cirrosis hepática, disminuye el metabolismo de la ketamina e incrementa su biodisponibilidad cuando se administra por vía oral (Peltoniemi et al., 2016).

La norketamina es posteriormente hidroxilada y conjugada, resultando un compuesto hidrosoluble e inactivo, que finalmente es excretado junto con el resto de metabolitos por la orina. Se describe un aclaramiento  $CL = 12 - 17$  ml/kg/min y un tiempo medio ( $t_{1/2}$ ) de eliminación = 2.17h (Katzung et al., 2013).

Como es bien conocido, los parámetros y el comportamiento farmacocinéticos de una droga, pueden variar si aumentamos las dosis administradas, si mantenemos una infusión continua de la droga o si cambia la composición macromolecular del organismo, en el caso de la ketamina, la administración continua de la misma a través de un sistema de infusión, es ampliamente utilizada en la anestesia intravenosa, para el mantenimiento del estado anestésico disociativo por periodos de tiempo superiores a la vida media de este fármaco.

Actualmente, algunos modelos teórico-matemáticos pueden ser utilizados para predecir el comportamiento de la ketamina en perfusión intravenosa, el simulador Rugloop es el ejemplo de una herramienta digital, que permite calcular la vida media sensible al contexto (tiempo necesario para la disminución del 50% de la

concentración plasmática de un fármaco, posterior a la suspensión de una infusión continua), la concentración plasmática teórica siguiendo un modelo de distribución tricompartmental en el tiempo y otros marcadores farmacocinéticos, cuando se requiere el mantenimiento del efecto biológico de la ketamina por largos periodos de tiempo (Navarrete Zuazo, 2014), permitiendo así un mejor control de los efectos terapéuticos deseados y evitando infra o sobredosificaciones.

Se describirán brevemente algunas de las características de la administración parenteral de ketamina. Después de su administración intramuscular, la ketamina sufre un metabolismo de primer paso, permitiendo una biodisponibilidad del 93%. El tiempo de inicio de efecto es de 5 minutos, la vida media de la fracción activa es de 1 a 3 horas y la duración del efecto clínico dura en promedio 2 horas (Quibell et al., 2011). La vía intramuscular puede utilizarse cuando no se dispone de un acceso venoso periférico o se pretende su administración en dosis única.

La administración de ketamina por vía oral, es principalmente utilizada en el tratamiento del dolor crónico, posterior a su ingesta, la biodisponibilidad es del 20%, el tiempo de inicio de acción oscila en los 30 min y la duración de sus efectos es de 4 a 12 horas, cabe destacar que el principal metabolito activo en esta vía es la norketamina, dado el amplio metabolismo de primer paso y el retraso en el inicio del efecto, está determinado por la lenta absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal (Katzung et al., 2013).

En el caso de la vía sublingual, la biodisponibilidad de la ketamina es del 30 y de 45% respectivamente, aunque en la actualidad, estas vías de administración están en desuso (Quibell et al., 2011).

Las diferencias en el perfil farmacocinético de la ketamina, permite al profesional de la salud, la elección de la vía de administración más conveniente, de acuerdo al objetivo terapéutico en cada paciente; si se desea un rápido inicio y una corta duración del efecto clínico, se preferirá la vía iv. En el caso contrario, si administramos ketamina por vía oral, el tiempo necesario para que se presente el efecto biológico será mayor, pero también la duración del mismo. El primer escenario, se puede ejemplificar clásicamente en el uso de la ketamina como anestésico general y el segundo, en el contexto de la ketamina como adyuvante en el tratamiento del dolor crónico, depresión y adicciones.

## Efectos sobre el sistema nervioso central

La ketamina ejerce sus principales efectos sobre el SNC, dichos efectos, son traducidos en manifestaciones clínicas dependientes de la dosis utilizada y de la susceptibilidad de cada sujeto.

El bloqueo de la conducción nerviosa por ketamina, produce anestesia disociativa, la cual se caracteriza por un estado de catalepsia, catatonía, analgesia y amnesia, pero a diferencia de otros anestésicos, no hay una pérdida de la conciencia (Quibell et al., 2011). Se puede concebir entonces, como un estado donde un sujeto consciente, se disocia de la realidad y mantiene un estado anestésico. Esto se corresponde con el trazo encefalográfico que produce la ketamina, el cual muestra un patrón de “estallido gamma” que consiste en oscilaciones alternas de ondas lentas tipo delta con ondas tipo gamma. Además, se asocia con un aumento en las oscilaciones de ondas theta y una disminución de las oscilaciones alfa/beta, lo que traduce, un bloqueo de las entradas de NMDA en el tálamo, provenientes del tronco cerebral. Esta teoría, descrita por Akeju, sugiere que las vías de activación glutaminérgica que surgen del tronco encefálico (desde el núcleo parabraquial y la formación reticular pontina medial) hasta el tálamo son mediadas por el canal NMDA. Su bloqueo, produciría entonces el estado anestésico disociativo.

A la par, la ketamina produce un patrón epileptiforme en áreas del sistema límbico (Álvarez Ríos et al., 2004). Un sistema asociado a las emociones, la personalidad y la conducta, lo que puede explicar la presencia de sueños vívidos, alucinaciones, experiencias psicodélicas, distorsión de la realidad, euforia, percepciones auditivas, visuales y táctiles alteradas e intensificadas (Eldufani et al., 2018; Quibell et al., 2011).

Cabe destacar que no se registra actividad epileptiforme en la corteza cerebral con el uso de ketamina (Álvarez Ríos et al., 2004). Por el contrario, este fármaco es utilizado para mitigar estados epilépticos refractarios a otros anticonvulsivos. El mecanismo de acción sugerido es el bloqueo de la actividad del glutamato y glicina (ambos neurotransmisores despolarizantes) a nivel cortical, pero con dosis subanestésicas de ketamina (Sabharwal et al., 2015).

Las experiencias psicodélicas, místicas, extracorpóreas y de “fusión con el entorno” que produce la ketamina a dosis bajas (subanestésicas), pueden ser encuadradas en un modelo de esquizofrenia inducida farmacológicamente (Ezquerro Romano et al., 2018). Tales experiencias resultan ser desagradables en la mayoría de los sujetos,

sin embargo, usuarios de drogas de abuso, consumen ketamina a dosis subanestésicas para buscar dichos efectos. Keta-K, vita-K, especial K, son algunos de los nombres otorgados a la ketamina, por usuarios de este fármaco como droga de abuso (Pérez Pérez et al., 2003).

La administración de ketamina inhibe la recaptación neuronal de catecolaminas en el SNC, el estado hiperadrenérgico secundario (Kohrs et al., 1998), aumenta el consumo metabólico de oxígeno, produce vasodilatación de la vasculatura y un aumento del flujo sanguíneo cerebral (Katzung et al., 2013). Aunque inicialmente se mencionaba que estos fenómenos cerebrales, aumentaban drásticamente la presión intracraneal (PIC), esta afirmación se fundamentaba en observaciones en pacientes con patologías cerebrales como la hidrocefalia e hipertensión intracraneal previa (Green et al., 2015). Esto mermó el uso de éste fármaco en sujetos con enfermedades neurológicas.

Sin embargo, Schwedler demuestra que la administración de ketamina directamente en tejido cerebral de animales de experimentación bajo ventilación mecánica, no produjo un aumento en el flujo sanguíneo cerebral. La hipótesis que parece explicar estos hallazgos contradictorios, es que el aumento del flujo cerebral, está mediado por la hipoventilación e hipercapnia que produce la ketamina, en sujetos bajo ventilación espontánea y no por un efecto mediado directamente por vasodilatación cerebral (Katzung et al., 2013). La controversia pudo esclarecerse con la publicación de dos revisiones sistemáticas publicadas por Cohen y Loffin respectivamente, donde posterior a la evaluación de ensayos clínicos controlados con cierto grado de heterogeneidad, no encontraron un aumento de la presión intracraneal con el uso de ketamina en comparación con la administración de opioides.

A manera de conclusión en este punto, la ketamina puede aumentar o disminuir el flujo sanguíneo cerebral en algunos pacientes, pero la presión de perfusión cerebral no se ve afectada significativamente. No hay casos reportados de pacientes que hayan sufrido daño cerebral por un aumento de la PIC, asociado al uso de éste fármaco, a excepción de aquellos con hidrocefalia coexistente. Así, la ketamina comienza a utilizarse de nuevo por médicos clínicos en la actualidad, para sedación, analgesia y anestesia, en pacientes críticamente enfermos sin hidrocefalia (Cohen et al., 2015).

Otros efectos comunes tras la administración de ketamina son mareo, náusea, visión borrosa y cefalea (Short et al., 2018). Los cuales están fuertemente asociados con el agonismo sobre receptores opioides (Rosenbaum et al., 2018).

## Efectos sobre el sistema cardiovascular

El aumento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial, son los dos efectos clásicos de la ketamina sobre el sistema cardiovascular. Hay un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica, así como de la frecuencia cardiaca con dosis subanestésicas de ketamina, pero sin llegar a cifras de hipertensión arterial (Liebe et al., 2017). Con dosis anestésicas, se presenta una hipertensión arterial transitoria, con un aumento del consumo metabólico de oxígeno en el miocardio. El estado hipertensivo transitorio, no es constante en todos los pacientes. La variabilidad biológica y el estado general del sujeto que recibe ketamina, son factores que favorecen la exacerbación de estos efectos (Short et al., 2018).

El mecanismo por el que se produce la taquicardia y aumento de la tensión arterial, no se conoce con precisión. Teóricamente, la ketamina inhibe la recaptura sistémica de catecolaminas, esto produce un aumento en las resistencias vasculares periféricas y en la función de marcapasos del corazón. Sin embargo, el inotropismo cardiaco se ve disminuido por un bloqueo directo de la ketamina sobre canales de calcio tipo L, voltaje-dependientes (Alexander et al., 2018). Lo que pudiera explicar, el aumento relativo de la presión arterial (sin llegar a cifras de hipertensión), en pacientes medicados con ketamina.

A nivel de la vasculatura pulmonar, se describía un efecto simpaticomimético (Alvarez Ríos et al., 2004). Sin embargo, Friesen demuestra en un ensayo clínico reciente, que no existe un aumento clínicamente significativo en la presión arterial pulmonar media, ni en las resistencias vasculares pulmonares. Estos hallazgos se sustentan en la monitorización objetiva de dichos parámetros pulmonares, mediante un cateterismo continuo en pacientes medicados con ketamina.

Finalmente, en la actualidad se recomienda el uso de ketamina para la inducción anestésica en pacientes con hipertensión arterial, especialmente en el ámbito pediátrico, dado que resulta segura y eficaz (Friesen et al., 2016; Williams y Friessen, 2012).

## *Efectos sobre el sistema respiratorio*

En términos generales, la ketamina tiene efectos mínimos sobre la frecuencia respiratoria en pacientes sanos. Tras la administración rápida del fármaco, pueden

existir periodos de apnea intermitente, intercalados con periodos de taquipnea. No se presentan alteraciones de la presión arterial de CO<sub>2</sub>, ni en la vasoconstricción pulmonar hipóxica (Álvarez Ríos et al., 2004), por lo que resulta conveniente su utilización para la inducción anestésica y la sedación en procedimientos que requieren la ventilación espontánea del paciente.

Sin embargo, no se puede garantizar la permeabilidad del tracto respiratorio con el uso de ketamina. Aunque es bien conocido este medicamento relaja el musculo liso bronquial, también aumenta la cantidad de secreciones en el árbol respiratorio y puede producir espasmo bronquial, en especial en niños (Katzung et al., 2013). Así, se recomienda la administración de anticolinérgicos, en especial en pacientes con hiperreactividad bronquial o asma, cuando se hace uso de la ketamina para la inducción anestésica (Álvarez Ríos et al., 2004; Eldufani et al., 2018).

### Efectos sobre el sistema genitourinario

Los efectos sobre el sistema genitourinario son raros tras la administración de una monodosis de ketamina. Sin embargo, la ingesta continua vía oral, puede causar cistitis intersticial, aumento de la actividad del músculo detrusor, reflujo vesicoureteral e hidronefrosis (Cheung et al., 2011). En algunos casos, incluso puede condicionar necrosis papilar, daño y falla renal irreversible. La fisiopatología no es clara, pero se sugiere que dicho efectos, son secundarios a una irritación progresiva del urotelio por acción directa de la ketamina o sus metabolitos (Cheung et al., 2011; Quibell et al., 2011).

Las alteraciones urinarias secundarias al uso de ketamina, son dosis y tiempo dependientes, así que son muy frecuentes en personas que consumen este fármaco como droga de abuso y raras en pacientes tratados médicamente con dosis subanestésicas de ketamina (Quibell et al., 2011). Por citar un ejemplo, Cheung, reporta que 90% de sujetos que consumieron ketamina como droga de abuso por más de dos años, presentan sintomatología urinaria. En contraparte, solo existen reportes de casos aislados de alteraciones urinarias con el uso de ketamina en el contexto médico terapéutico (Quibell et al., 2011).

Debe discontinuarse el uso del medicamento ante síntomas urinarios como disuria, hematuria, poliuria etc., que no puedan ser explicados por una infección bacteriana u otra etiología (Quibell et al., 2011; Short et al., 2018). Aunque se reporta

que los efectos deletéreos, no desaparecen en todos los casos tras cesar la administración de este medicamento (Cheung et al., 2011).

### Efectos en el sistema gastrointestinal

Aunque con baja incidencia (alrededor del 7%), la náusea y vómito son los síntomas gastrointestinales más frecuentes asociados al uso de ketamina (Thorp et al., 2009). El mecanismo parece indicar, que existe una influencia de la ketamina sobre la liberación de acetilcolina en el tracto gastrointestinal, así como sobre sistemas dopaminérgicos en el sistema nervioso central (Short et al., 2018). Los resultados de ensayos clínicos parecen indicar que estos síntomas son dosis dependientes. La administración de más de 7mg/kg de ketamina, parece incrementar moderadamente la incidencia de náusea y vómito, en especial en niños (Thorp et al., 2009).

Por otro lado, se han reportado algunos casos de hepatotoxicidad con el uso repetitivo de ketamina. Este grave efecto, está probablemente asociado a un aumento progresivo de la peroxidación lipídica y la formación de radicales libres a nivel hepático (Bell, 2012). De igual forma, se describen casos raros de dilatación de la vesícula y vía biliar. En teoría estos eventos están asociados a una relajación del musculo liso biliar por el bloqueo del receptor NMDA (Hewitt et al., 2018). A pesar de que estos efectos secundarios son descritos en pacientes medicados con ketamina por largos periodos de tiempo, deben tenerse en consideración, sobre todo en sujetos con otros factores de riesgo para falla hepática o alteraciones de la vía biliar (Hewitt et al., 2018; Short et al., 2018).

### Efectos sobre el sistema inmune

La ketamina parece tener efectos antiinflamatorios y analgésicos, derivados de la regulación en la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias (Eldufani et al., 2018). A través de mecanismos aún en estudio, se propone que la ketamina modula los efectos del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , las interleucinas- $1\beta$  y 6, mediante la inhibición del RNA mensajero de macrófagos activados por lipopolisacáridos (Beilin et al., 2007). En el caso particular del trauma cerebral, se describe una posible

modulación del factor nuclear  $\kappa\beta$  y de receptores tipo toll, que limitan el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la activación de células endoteliales y por ende la migración de células inflamatorias, tras lesiones cerebrales hemorrágicas. Posterior a estos descubrimientos, continúan los estudios que indagan sobre posibles efectos no sólo en la modulación del dolor crónico por vías dependientes de sistemas NMDA, AMPA, etc., sino también un posible efecto directo de la ketamina como un antiinflamatorio en la cascada del ácido araquidónico (Eldufani et al., 2018).

### Uso clínicos de la ketamina

Se expusieron las características principales de la ketamina y sus efectos sobre distintos órganos y sistemas, haciendo posible la elaboración de hipótesis sobre su utilidad en el manejo y tratamiento de múltiples enfermedades o patologías en el ser humano, sin embargo, la extrapolación de estudios de experimentación básica al campo de la investigación clínica, ha revelado que los efectos benéficos de la ketamina se encuentran limitados en muchos casos.

La Food And Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) aprueba el uso de ketamina sólo para la inducción y mantenimiento anestésico en humanos. Sin embargo, la ketamina resulta una opción terapéutica en distintas patologías fuera del campo anestésico, cuando fármacos de primera línea, no logran los efectos terapéuticos deseados. Por otro lado, el constante descubrimiento de nuevos fármacos eficaces y seguros, combinado con la restricción en la comercialización y distribución de la ketamina, por su consumo como droga de abuso, ha mermado su empleo terapéutico en gran medida. A continuación se describirán los principales escenarios clínicos donde existe alguna evidencia clínica de su eficacia y seguridad.

### Ketamina en anestesia

La elección de la vía de administración de la ketamina obedece al objetivo terapéutico. En el contexto anestésico, la vía de administración preferida es la intravenosa. Ofrece un efecto terapéutico rápido y al ser la más estudiada, los efectos deseados pueden ser más fácilmente alcanzados con dosis estandarizadas. La excepción, la

encontramos en el área de la anestesia pediátrica. Los niños frecuentemente tienen aversión por las punciones venosas, por lo que la vía intramuscular o la vía oral, son opciones factibles para la inducción anestésica, pues hacen prescindible un acceso venoso.

La anestesia disociativa, amnesia y analgesia obtenidas tras la administración de ketamina, permiten la realización de procedimientos quirúrgicos menores, sin la necesidad de la asociación con otro fármaco. Cuando se utiliza vía IV, los efectos son dosis dependientes. Clásicamente, se describe que con una concentración plasmática ( $C_p$ ) por debajo de  $0.1 \mu\text{g/ml}$ , la ketamina no produce efecto alguno. Entre  $0.1$  y  $0.35 \mu\text{g/ml}$  se hace evidente su efecto analgésico. Entre  $0.35$  y  $0.4 \mu\text{g/ml}$  se observa el clásico efecto anestésico disociativo y cuando la  $C_p$  supera los  $0.5 \mu\text{g/ml}$ , se presentan efectos secundarios deletéreos, como el delirio posoperatorio, el aumento excesivo de la frecuencia cardíaca, tensión arterial, secreciones bronquiales, etc. (Navarrete Zuazo, 2014).

Las dosis utilizadas para una inducción anestésica son de  $1-2 \text{ mg/kg IV}$ ,  $2-10 \text{ mg/kg IM}$ ,  $3-6 \text{ mg/kg VO}$ ,  $5-10 \text{ mg/kg}$  vía transrectal y  $2-4 \text{ mg/kg}$  vía intranasal (Khurmi et al., 2017).

Uno de los diferenciadores de la ketamina, cuando se compara con otros anestésicos, es su escasa influencia sobre la frecuencia respiratoria, así, resulta de utilidad como inductor anestésico, en pacientes que requieren mantener una ventilación espontánea. En contraparte, el aumento de las secreciones bronquiales hace necesaria la administración de un anticolinérgico, para garantizar una permeabilidad de las vías respiratorias en el paciente anestesiado con ketamina (Álvarez Ríos et al., 2004).

Inicialmente, se había descrito la capacidad broncodilatadora de la ketamina en modelos biológicos (Hirshman et al., 1979) y en algunos reportes de casos en pacientes asmáticos (Strube et al., 1986). Sin embargo, ensayos clínicos posteriores dieron lugar a un metanálisis, en el cual, no fue posible encontrar evidencia que sustentara el efecto broncodilatador de la ketamina. Sugiriendo la necesidad de ensayos clínicos controlados con un mejor diseño metodológico para justificar el uso de este fármaco en pacientes asmáticos (Jat et al., 2012). Con base en este metanálisis, parece que la ketamina no ofrece un efecto broncodilatador clínicamente relevante como se pensaba.

Otro aspecto a destacar con el uso de la ketamina, es la estabilidad hemodinámica que ofrece durante la inducción anestésica (Álvarez Ríos et al., 2004). De ahí, que sea

recomendada en pacientes hipotensos y puede sustituir fármacos como el propofol o midazolam, que provocan o acentúan la hipotensión posterior a la inducción anestésica. Se describe que la frecuencia cardíaca y la presión arterial sistólica aumentan en cierta medida en pacientes con choque hipovolémico leve, inducidos anestésicamente con ketamina. Sin embargo, este efecto en la presión arterial sistólica se pierde cuando el choque es grave, manteniéndose sólo en cierta medida el aumento de la frecuencia cardíaca (Miller et al., 2016).

Hasta este punto, podemos considerar que la ketamina es un fármaco con bondades útiles en el ámbito anestésico, sin embargo, las alucinaciones vívidas con dosis anestésicas son el principal inconveniente de su utilización, como un inductor anestésico aislado, siendo necesaria la administración cotidiana de benzodiazepinas de acción corta o intermedia como el midazolam, que permitan antagonizar de forma importante este efecto psicotrópico. Además, la analgesia producida por la ketamina, es suficiente para procedimientos sencillos y de baja intensidad dolorosa, en caso contrario, se requieren de analgésicos potentes tipo opioides, para ofrecer una analgesia suficiente en cirugías mayores, así, la ketamina se restringe a su uso como anestésico único en procedimientos de baja complejidad y en particular en niños, pues la incidencia de alucinaciones desagradables en este grupo etario, disminuye conforme decrece la edad de los pacientes, siendo un efecto secundario casi nulo en preescolares y lactantes. En contraparte, es un efecto secundario constante en adultos, en quienes la ketamina es útil como un adyuvante anestésico, en el marco de una anestesia general balanceada (combinación de varios anestésicos intravenosos e inhalados) o una anestesia general intravenosa (combinación de anestésicos intravenosos) (Alvarez Ríos et al., 2004).

Considerando a la ketamina como un adyuvante anestésico, dosis subanestésicas en infusión continua, son utilizadas en la técnica denominada anestesia total intravenosa (ATIV). El objetivo de esta técnica, consiste en la potencialización de los efectos de anestésicos individuales y la disminución de efectos secundarios. La ATIV consiste en utilizar combinaciones de fármacos en infusiones continuas intravenosas, que siguiendo el farmacológico de distribución de cada medicamento, permita al anestesiólogo, alcanzar un estado anestésico. Dicho estado está caracterizado por hipnosis, parálisis muscular, anestesia y el mantenimiento de la homeostasis. Además permite potencializar el efecto analgésico postoperatorio, después de suspender la administración de todos los medicamentos infundidos (Navarrete Zuazo, 2014).

## Ketamina para dolor agudo posoperatorio

Se han investigado los efectos de la ketamina en infusión continua IV a dosis subanestésicas de entre 0.2 a 0.5 mg/kg/h (dosis como adyuvante anestésico), para disminuir el dolor después de una cirugía, la náusea y el vómito (Kurdi et al., 2014). Resultados derivados de metanálisis de ensayos clínicos controlados, sugieren que esta intervención, disminuye los requerimientos de analgésicos en el periodo posoperatorio. La forma clásica de evaluar la eficacia en este sentido, es la cuantificación de los requerimientos en miligramos de morfina que un sujeto requiere, para el alivio del dolor, después de ser intervenido quirúrgicamente. En términos cuantitativos, la infusión de ketamina IV durante una cirugía disminuye el consumo de morfina en promedio 15.96 mg, con un intervalo de confianza al 95% (IC95%) de 19.69 a 12.24 mg, es decir, algunos pacientes se benefician más que otros (pacientes disminuyen hasta 19.69 mg el consumo de morfina y otros solo 12.24 mg). La distinta magnitud del efecto en cada paciente, obedece a causas multifactoriales, destacando entre ellas, la variabilidad biológica (Bell et al., 2006).

El mismo metanálisis, calcula la disminución del riesgo relativo a náusea y vómito por separado, y náusea con vómito después de una cirugía mayor. Para este fin se reporta como medida de riesgo, el riesgo relativo con su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC95). El RR para náusea después de una cirugía fue de  $RR = 0.80$  IC95% (0.65 a 0.98), en otras palabras, la ketamina disminuye en promedio 20% el riesgo de presentar náusea en el posoperatorio. El riesgo relativo para vómito fue de  $RR = 0.43$  IC95% (0.25 a 0.74). La traducción clínica sería que la ketamina disminuye en promedio 57% del riesgo de vómito posoperatorio. Finalmente, el riesgo relativo de presentar náusea con vómito posoperatorios fue  $RR = 0.77$  IC95% (0.65 a 0.90) (Bell et al., 2006).

En conclusión, la ketamina utilizada como un adyuvante anestésico y con las posologías mencionadas, disminuye el consumo posoperatorio de analgésicos, el riesgo de náusea y vómitos. Aunque estos hallazgos, específicamente hablando del efecto antihemético encontrado, pudieran contradecir lo expuesto en apartados anteriores. La posología utilizada y la combinación con otros anestésicos y sus respectivos mecanismos de acción, pueden llevarnos a responder el cuestionamiento de forma hipotética, pues el mecanismo no se ha establecido con claridad.

Cuando se describen las propiedades antiinflamatorias, analgésicas y de modulación de la transmisión del dolor de la ketamina, se sugiere que existe un posible beneficio de este fármaco, para disminuir el riesgo de presentar dolor crónico posoperatorio (Eldufani et al., 2018). Este dolor es un síndrome que se presenta después de un procedimiento quirúrgico con una duración de al menos 2 meses, excluyendo alguna otra etiología y se presenta con una incidencia del 11% de todas las cirugías estudiadas. Derivado de esta hipótesis, se han realizado diversas investigaciones al respecto, con resultados contradictorios debido a una alta heterogeneidad en la metodología, posología y diseño de los estudios. Finalmente, dos metanálisis (Chaparro et al., 2013; McNicol et al., 2014), publican que existe una posible disminución del riesgo de presentar dolor crónico posoperatorio con la utilización de ketamina, pero los resultados no son convincentes, requiriendo más estudios, estandarización de las dosis administradas y menor riesgo de sesgo para establecer conclusiones sólidas.

### Ketamina en dolor crónico

El advenimiento de nuevos anestésicos, ha desplazado a la ketamina para su uso en el control del dolor crónico (dolor con duración mayor a 6 meses), en especial para aquel derivado de alteraciones en las vías nociceptivas, mejor conocido como dolor neuropático. Algunos modelos de dolor neuropático bien descritos, son la neuropatía diabética dolorosa, el dolor asociado a herpes, el síndrome doloroso regional complejo y el dolor en miembro fantasma (López Millán et al., 2007). Estos síndromes se caracterizan entre muchas cosas, por una activación anormal de receptores NMDA, que conllevan un fenómeno de sensibilización de las sinapsis neuronales. Así se perpetúa la sensación dolorosa, hasta originar síntomas como la alodinia, hiperalgesia y disestesias. Estos síntomas son característicos del dolor neuropático, sea especialmente difíciles de tratar con analgésicos comunes (Yam et al., 2018).

La administración de ketamina vía oral para el control del dolor crónico, ha crecido en los últimos años. Esta vía es caracterizada por su baja biodisponibilidad, debido a su metabolismo de primer paso y por la formación de norketamina como metabolito activo. A pesar de que no se dispone de una presentación en cápsulas, tabletas o un medio que facilite la administración oral de ketamina, la literatura describe preparados realizados empíricamente con jarabes de glucosa, que mantienen

el fármaco estable por algunos días y que han servido para evaluar el efecto analgésico en algunos modelos de dolor neuropático (López Millán et al., 2007). Sin embargo, la alta incidencia de efectos psicotrópicos secundarios, náusea y mareo (hasta 50% de los pacientes) limita el apego terapéutico por esta vía de administración (Quibell et al., 2011).

Otra vía de administración utilizada en el dolor crónico, es la transcutánea. No obstante ensayos clínicos revelaron que los efectos en el control del dolor crónico no fueron superiores al placebo, por lo que fue abandonada con rapidez (López Millán et al., 2007).

La administración intravenosa en dosis bajas (0.25mg/kg) es una alternativa a este problema. Aunque el principal inconveniente es la necesidad de una vía venosa periférica constante, que también limita el apego terapéutico (Sleigh et al., 2014).

A pesar de estas limitaciones, algunos médicos clínicos han utilizado la ketamina vía oral para el control del dolor neuropático cuando otros fármacos de primera línea no consiguen el alivio de los síntomas (Eldufani et al., 2018). Las dosis de inicio oscilan entre los 10 a 25 mg cada 6 a 8 h y se incrementan de forma progresiva hasta 50 a 100 mg cada 8 h. La dosis tope descrita es de 200 mg cada 6 h. La posología utilizada se titula con base en la eficacia analgésica obtenida y la presencia de efectos adversos, pues no existe una dosis estandarizada para el manejo del dolor neuropático. Los ensayos clínicos refieren que una dosis eficaz para el alivio del dolor neuropático, es aquella que disminuye de entre 30% al 50% la intensidad inicial del dolor. Tomando este parámetro de eficacia, la ketamina ha sido utilizada para el control del dolor por miembro fantasma (Alviar et al., 2007), síndrome doloroso regional complejo (O Connell et al., 2013), dolor neuropático de origen central, neuropatía diabética dolorosa, incluso en síndromes migrañosos y otros de difícil manejo (Neira Reyna et al., 2016). Aunque en términos cuantitativos, la mayoría de estos estudios refieren una disminución de 1 a 3 puntos de la intensidad del dolor (medida en una escala visual análoga del 0 al 10), comparando ketamina vs placebo, en muchas ocasiones, es suficiente para considerarla como un fármaco eficaz, ante la ausencia de respuesta a otros tratamientos previamente utilizados.

Se le ha dado un enfoque similar, al uso de la ketamina en casos de dolor complejo oncológico, especialmente cuando este presenta un componente neuropático. Las dosis utilizadas, son similares a las mencionadas para dolor neuropático no oncológico. Mientras la seguridad y eficacia parecen tener la misma magnitud el efecto. De

ahí que la ketamina es un potencial adyuvante analgésico, en casos de difícil control del dolor en el área de cuidados paliativos (Kurdi et al., 2014).

### Ketamina en trastornos neurológicos

El manejo de trastornos neurológicos como las crisis convulsivas, el trauma cerebral, los eventos hemorrágicos o isquémicos cerebrales, etc., requiere en muchas ocasiones de fármacos que permitan el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral, disminuyan la actividad convulsiva y permitan la sedo-analgesia en pacientes neurocríticos. La literatura médica hace referencia sobre el uso de la ketamina para estos fines (Eldufani et al., 2018).

El bloqueo del receptor NMDA por la ketamina ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de estados epilépticos de más de 24 h de duración, cuando las convulsiones no remiten a pesar de ser tratados con otros anestésicos como benzodiacepinas, barbitúricos o propofol (Höfler et al., 2016). Las dosis utilizadas en infusión continua para este efecto, oscilan entre los 25 y 175 mcg/kg/min. La duración de la infusión en promedio es reportada entre 3 a 6 días y depende de la resolución de las convulsiones. La ketamina en monoterapia o su combinación con propofol, es una opción terapéutica para el estatus epiléptico refractario. La ventaja adicional, es que atenúa los efectos cardiovasculares deletéreos de otros anestésicos (Höfler et al., 2016; Sabharwal et al., 2015).

En el área de cuidados neurocríticos, la ketamina es también una opción para la sedo-analgesia en pacientes con trauma cerebral. Sus ventajas son: la ausencia de hipotensión arterial y escasos efectos en la presión intracraneal (incluso disminuyendo la misma), facilita la ventilación mecánica y brinda analgesia. Su principal desventaja, es la presencia de efectos psicotrópicos, que hace necesario el uso de benzodiacepinas, para limitar dichos efectos (Zeiler et al., 2014). En este escenario las dosis utilizadas son bolos de 1.5 a 3mg/kg e infusiones continuas a dosis de 50 a 85 mcg/kg/min, de acuerdo a los objetivos deseados y la respuesta individual en los pacientes tratados (Patanwala et al., 2015; Zeiler et al., 2014).

Dos trastornos neurológicos frecuentes en pacientes sometidos a cirugía no craneal, pero con factores de riesgo para trastornos neurológicos (edad avanzada, enfermedad de alzheimer, etc.) son el delirium y la disfunción cognitiva posoperatorios. La ketamina

ha sido estudiada para disminuir tales trastornos. Finalmente un metanálisis de ensayos clínicos controlados (Hovaguimian et al., 2018) concluyó que la ketamina parece no disminuir el riesgo de delirium, pero si disminuye el riesgo de disfunción cognitiva postoperatoria con un RR = 0.34 IC95% (0.15 a 0.73), teniendo un potencial efecto neuroprotector en este sentido. El mecanismo de acción propuesto es la disminución de la inflamación, apoptosis y microtrombosis incluso tras la administración de una dosis única iv previo al inicio de una cirugía.

Fuera del ámbito quirúrgico y de cuidados intensivos, algunos autores (Eldufani et al., 2018; Sleight et al., 2014), refieren que la ketamina resulta ser un adyuvante prometedor en sujetos con depresión. El mecanismo de acción parece estar relacionado con la regulación en las concentraciones de dopamina y su interacción con una serie compleja de vías de señalización alteradas en el síndrome depresivo mayor. Sin embargo, resultados de revisiones sistemáticas, refieren que este efecto sólo es posible observarlo en algunos pacientes, con dosis repetitivas semanalmente. Las conclusiones al respecto fueron que se requieren más ensayos clínicos y con mejores características metodológicas, para poder sustentar estas afirmaciones (Mccloud et al., 2015; Short et al., 2018).

Se describe que pacientes con Alzheimer pueden verse beneficiados con el uso de ketamina en dosis intermitentes. La hipótesis de la hiperactividad de receptores glutaminérgicos y su bloqueo con ketamina, pudiera explicar la mejoría de los síntomas en pacientes tratados con dicho fármaco, pero se requieren de mayor evidencia en esta línea de investigación, para corroborar esta hipótesis (Eldufani et al., 2018).

Finalmente, algunas personas con ansiedad generalizada, mejoran sus síntomas con la administración de ketamina semanal a bajas dosis, el mecanismo de acción tampoco es conocido con precisión, pero algunos estudios, parecen evidenciar este efecto en pacientes que son resistentes a otras terapéuticas (Shadli et al., 2018).

## CONCLUSIÓN

La ketamina es un anestésico disociativo que ha sido ampliamente utilizado en el ámbito de la anestesia, el dolor posoperatorio, el dolor crónico, los cuidados neurocríticos y otros trastornos neurológicos.

Sus efectos psicotrópicos, cardiovasculares, respiratorios, etc., se deben en gran parte al bloqueo de receptores NMDA. Aunque se refieren otros mecanismos de acción, que permiten la utilización de éste fármaco en distintos entornos clínicos, no siempre son bien conocidos.

Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la ketamina, permiten su administración por distintas vías, sin embargo, sólo se comercializa en solución inyectable. Mientras la vía IV es la más utilizada en la práctica anestésica y cuidados intensivos, la vía oral es la más frecuente en el control del dolor crónico y otras indicaciones de la ketamina. Una de las causas principales de la falta de apego terapéutico en pacientes tratados con ketamina vía oral es la presencia de alucinaciones. Sugiriendo la necesidad de otros diales de liberación controlada, que modifiquen su rápida absorción en la mucosa intestinal, limitando así este y otros efectos secundarios.

Es frecuente y necesario el uso concomitante de benzodiazepinas para limitar los efectos psicotrópicos deletéreos de la ketamina. La excepción es el caso de los neonatos y preescolares, en quienes no se reportan las alucinaciones o sueños vívidos a diferencia del adulto.

El advenimiento de nuevos fármacos, ha desplazado el uso de la ketamina en contextos no anestésicos como el dolor crónico y frecuentemente está indicada cuando otros fármacos no son eficaces en primera instancia. Se requieren de más estudios en distintas líneas de investigación, que puedan sustentar hipótesis de utilidad farmacológica de la ketamina para distintas enfermedades y escenarios clínicos. De igual forma, son necesarios ensayos clínicos con el rigor metodológico suficiente, para extrapolar los resultados de estudios experimentales en modelos animales, al ser humano y eliminar controversias entre distintos autores.

Un último punto a destacar es el uso de la ketamina como droga de abuso. Esta situación, ha mermado su comercialización en varios países. Emerge entonces la necesidad de modificaciones a la normatividad para su venta y distribución. Dichos cambios pueden ser fundamentales para mejorar la disponibilidad del fármaco con fines terapéuticos.

## REFERENCIAS

- Alexander, E. y Leung, J. G., 2018. Ketamine Use in the Intensive Care Unit. *AACN Advanced Critical Care*, 29 (2), 101-106.
- Alvarez Ríos, J. J., Vanegas Hernández, M. A., López Beltrán, A. M. y Manrique Carmona, L., 2004. Ketamina: 35 Años Después. *Anestesia En México, Suplemento*, 60-68.
- Alviar, M., Dungca, M. y Hale, T., 2007. Pharmacologic interventions for treating phantom limb pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews: Protocols* [en línea], (1), 1-52. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006380.pub3.www.cochranelibrary.com>
- Beilin, B., Rusabrov, Y., Shapira, Y., Roytblat, L., Greemberg, L., Yardeni, I. Z. y Bessler, H., 2007. Low-dose ketamine affects immune responses in humans during the early postoperative period. *British Journal of Anaesthesia* [en línea], 99 (4), 522-527. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/bja/aem218>
- Bell, R., Dahl, J., Moore, R. y Kalso, E., 2006. Perioperative ketamine for acute postoperative pain ( Review ). *The Cochrane Library*.
- Bell, R. F., 2012. Ketamine for chronic noncancer pain : concerns regarding toxicity. *Current Opinion Support Palliat Care* [en línea], 6, 183-187. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e328352812c>
- Chaparro, L. E., Smith, S. A., Moore, R. A., Wiffen, P. J. y Gilron, I., 2013. Pharmacotherapy for the prevention of chronic pain after surgery in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [en línea], (7), CD008307. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008307.pub2.www.cochranelibrary.com>
- Cheung, R. Y. K., Lee, J. H. S., Pang, A. W. L. y Chung, T. K. H. (2011). Urinary symptoms and impaired quality of life in female ketamine users: persistence after cessation of use. *Hong Kong Medecine Journal*, 17 (4), 267-273.
- Cohen, L., Athaide, V., Wickham, M. E., Doyle Waters, M. M., Rose, N. G. W. y Hohl, C. M., 2015. The Effect of Ketamine on Intracranial and Cerebral Perfusion Pressure and Health Outcomes: A Systematic Review. *Annals of Emergency Medicine* [en línea], 65 (1), 43-51. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2014.06.018>
- Domino, E. F., Chodoff, P. y Corssen, G., 1965. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man. *Clinical Pharmacology And Therapeutics* , 6 (3), 279-291.
- Eldufani, J., Nekoui, A. y Blaise, G., 2018. Nonanesthetic Effects of Ketamine: A Review Article. *American Journal of Medicine* [en línea], 10. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.04.029>

- Ezquerro Romano, I. I., Lawn, W., Krupitsky, E. y Morgan, C. J. A., 2018. Ketamine for the treatment of addiction: Evidence and potential mechanisms. *Neuropharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.017>
- Flores Soto, M. E., Chaparro Huerta, V., Escoto Delgadillo, M., Vazquez Valls, E., González Castañeda, R. y Beas Zaratea, C., 2012. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología* [en línea], 27 (5), 301-310. Disponibilidad en: <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2011.10.003>
- Friesen, R. H., Twite, M. D., Nichols, C. S., Cardwell, K. A., Pan, Z., Darst, J. R., ... Ivy, D. D., 2016. Hemodynamic response to ketamine in children with pulmonary hypertension. *Pediatric Anesthesia* [en línea], 26 (1), 102-108. Disponibilidad en: <https://doi.org/10.1111/pan.12799>
- Green, S. M., Andolfatto, G. y Krauss, B. S., 2015. Ketamine and Intracranial Pressure : No Contraindication Except Hydrocephalus. *Annals of Emergency Medicine* [en línea], 65 (1), 52-54. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2014.08.025>
- Guillamón Vivancos, T., Gómez Pinedo, U. y Matías-Guiu, J., 2015. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): *Neurología* [en línea], 30 (2), 119-129. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Hewitt, N. A., Hons, M. y Cox, P., 2018. Recurrent Subanesthetic Ketamine Infusions for Complex Regional Pain Syndrome Leading to Biliary Dilation, Jaundice, and Cholangitis: A Case Report. *Anesthesia and Analgesia Practice*, 10 (7), 168-170. <https://doi.org/10.1213/XAA.0000000000000650>
- Hirshman, C. A., Downes, H., Farbood, A. y Bergman, N., 1979. Ketamine block of bronchospasm in experimental. *British Journal of Anaesthesia* [en línea], 51 (8), 713-718. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/bja/51.8.713>
- Höfler, J., Rohrer, A., Kalss, G., Zimmermann, G., Dobesberger, J., Pilz, G., ... Trinka, E., 2016. (S) Ketamine in Refractory and Super-Refractory Status Epilepticus : A Retrospective Study. *CNS Drugs* [en línea], 30, 869-876. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0371-2>
- Hovaguimian, F., Tschopp, C., Beck-Schimmer, B. y Puhan, M., 2018. Intraoperative ketamine administration to prevent delirium or postoperative cognitive dysfunction: A systematic review and meta-analysis. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* [en línea], (May). Disponible en: <https://doi.org/10.1111/aas.13168>
- Islas, Á. A., Jorgensen, C. y Salinas Stefanon, E., 2017. Drogas. *Elementos*, 106, 21-26.

- Jat, K. y Chawla, D., 2012. Ketamine for management of acute exacerbations of asthma in children (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* [en línea], (11), 1-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009293.pub2.www.cochranelibrary.com>
- Katzung, B. G., Masters, S. B., y Trevor, A. J., 2013. *Farmacología Básica y Clínica*.
- Khurmi, N., Perene, P., Kraus, M. y Trentman, T., 2017. Pharmacologic Considerations for Pediatric Sedation and Anesthesia Outside the Operating Room : A Review for Anesthesia and Non-Anesthesia Providers. *Pediatric Drugs* [en línea], 19 (5), 433-446. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40272-017-0241-5>
- Kohrs, R., y Durieux, M. E., 1998. an Old Drug New Tricks. *Anesthesia and Analgesia*, 87, 1186-1193.
- Kurdi, M. S., Theerth, K. A. y Deva, R. S.. 2014. Anesthesia : Essays and Researches Ketamine : Current applications in anesthesia, pain , and critical care. *Anesthesia: Essays and Researche* [en línea], 8 (3), 283-290. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0259-1162.143110>
- Liebe, T., Li, S., Lord, A., Colic, L., Krause, A., Batra, A., ... Walter, MD, P., 2017. Factors influencing the cardiovascular response to subanesthetic ketamine: A randomized, placebo-controlled trial. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [en línea], 20 (11), 909-918. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx055>
- López Millán, J. M., y Sánchez-Blanco, C., 2007. Utilización de ketamina en el tratamiento del dolor agudo y crónico. *Revista de La Sociedad Espanola Del Dolor*, 14 (1), 45-65.
- MacDonald, J. F., Miljkovic, Z. y Pennefather, P., 1987. Use-Dependent Block of Excitatory Amino Acid Currents in Cultured Neurons by Ketamine. *Journal of Neurophysiology*, 58 (2).
- Marchesini, F. A., Williner, M. R., Mantovani, V. E., Goicochea, H. C., y Robles, J. C., 2004. Optimización de la Separación Enantiomérica de Ketamina por Electroforesis Capilar usando Carboxi- $\beta$ -ciclodextrina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23 (2), 201-205.
- Mccloud, T., Caddy, C., Jochim, J., Rendell, J., Diamond, P., Shuttleworth, C., ... Cipriani, A., 2015. Ketamine and other glutamate receptor modulators for depression in bipolar disorder in adults (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* [en línea], (9). Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011611.pub2.www.cochranelibrary.com>
- McNicol, E., Schumann, R. y Haroutounian, S., 2014. A systematic review and meta-analysis of ketamine for the prevention of persistent post-surgical pain. *Acta Anaesthesiologica Escandinavica* [en línea], 58, 1199-1213. En línea <https://doi.org/10.1111/aas.12377>

- Miller, M., Kruit, N., Hons, M., Heldreich, C. y Bris, M., 2016. Hemodynamic Response After Rapid Sequence Induction With Ketamine in Out-of-Hospital Patients at Risk of Shock as Defined by the Shock Index. *Annals of Emergency Medicine* [en línea], 68 (2), 181-182. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2016.03.041>
- Navarrete Zuazo, V. M., 2014. La alternativa de la ketamina. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37 (S1), 243-250.
- Neira Reyna, F., Ortega García, J. L. y Neira Ortega, B., 2016. La ketamina en el tratamiento del dolor crónico según medicina basada en la evidencia. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor* [en línea], 23 (6), 292-306. Disponibilidad en: <https://doi.org/10.20986/resed.2016.3462/2016>
- Neyra, F. y Orteja, J.. 2004. En el tratamiento del dolor crónico. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*, 11, 210-222.
- O Connell, N., Wand, B., Mcauley, J., Marston, L. y Moseley, G., 2013. Interventions for treating pain and disability in adults with complex regional pain syndrome- an overview of systematic reviews (Review). *The Cochrane Library* [en línea], (4), 1-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009416.pub2.www.cochranelibrary.com>
- Patanwala, A. E., Martin, J. R. y Erstad, B. L., 2015. Ketamine for Analgosedation in the Intensive Care Unit : A Systematic Review. *Journal of Intensive Care Medicine* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/0885066615620592>
- Peltoniemi, M. A., Hagelberg, N. M., Olkkola, K. T. y Saari, T. I., 2016. Ketamine : A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy. *Clinical Pharmacokinetics* [en línea], 55 (9), 1059-1077. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0383-6>
- Pérez Pérez, H., Rubio, C., Martín, R. y Hardisson, A., 2003. Toxicología de las drogas de síntesis. *Revista de Toxicología* [en línea], 20 (1), 182-186. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/919/91920304/%0A>
- Quibell, R., Prommer, E. E., Mihalyo, M., Twycross, R. y Wilcock, A. (2011). Ketamine. *Journal of Pain and Symptom Management* [en línea], 41 (3), 640-649. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2011.01.001>
- Reich, D. L., y Silvey, G., n.d. Special Article Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Canadian*, 186-197.
- Royo-Isach, J., Magrané, M., Domingo, M. y Cortés, B., 2004. Series propuestas terapéuticas. *Atención Primaria a La Salud*, 34 (3), 147-151.

- Sabharwal, V., Ramsay, E., Martinez, R., Shumate, R., Khan, F., Dave, H., ... McGrade, H., 2015. Epilepsy y Behavior Propofol-ketamine combination therapy for effective control of super-refractory status epilepticus. Range of Infusion Days. *Epilepsy y Behavior* [en línea], 52, 264-266. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.07.040>
- Sabharwal, V., Ramsay, E., Martinez, R., Shumate, R., Khan, F., Dave, H., ... McGrade, H., 2015. Propofol-ketamine combination therapy for effective control of super-refractory status epilepticus. *Epilepsy and Behavior* [en línea], 52, 264-266. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.07.040>
- Shadli, S. M., Kawe, T., Martin, D., Mcnaughton, N., Neehoff, S. y Glue, P. (2018). Ketamine Effects on EEG during Therapy of Treatment-Resistant Generalized Anxiety and Social Anxiety [en línea], 21, 717-724. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy032>
- Short, B., Fong, J., Galvez, V., Shelker, W. y Loo, C. K. (2018). Side-effects associated with ketamine use in depression: a systematic review. *The Lancet Psychiatry* [en línea], 5 (1), 65-78. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(17\)30272-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(17)30272-9)
- Sleigh, J., Harvey, M., Voss, L., y Denny, B., 2014. Ketamine-more mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*, 4 (2-3), 76-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tacc.2014.03.002>
- Strube, P. J. y Hallam, P. L., 1986. Ketamine by continuous infusion in status asthmaticus. *Anaesthesia*, 41, 1017-1019.
- Thorp, A. W., Brown, L., y Green, S. M., 2009. Ketamine-Associated Vomiting. *Pediatric Emergency Care*, 25 (1), 15-18.
- Williams, G. D. y Friessen, R. H., 2012. Administration of ketamine to children with pulmonary hypertension is safe: pro-con debate. *Pediatric Anesthesia* [en línea], 22 (11), 1042-1052. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/pan.12033>
- Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Adam, S. K., Manan, N. A. y Basir, R., 2018. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], 19 (8). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>
- Zeiler, F. A., Teitelbaum, J., West, M. y Gillman, L. M., 2014. The Ketamine Effect on ICP in Traumatic Brain Injury. *Neurocrit Care* [en línea]. Disponible en; <https://doi.org/10.1007/s12028-013-9950-y>

## DISOLUCIÓN INTRÍNSECA: REVISIÓN DE SU UTILIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

*Edna Teresa Alcántara Fierro<sup>1</sup>*

*Mariana Ortiz Reynoso<sup>1\*</sup>*

El desarrollo de nuevos y mejores medicamentos permite tratar con mayor eficacia y seguridad las enfermedades; así condiciones que eran fatales han dejado de serlo. Las entidades regulatorias requieren que los medicamentos cumplan con estrictas evaluaciones de identidad, potencia y pureza. La evaluación biofarmacéutica de un medicamento, es un parámetro importante para el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas, siendo la disolución la principal prueba *in vitro* para conocer la velocidad de liberación de un principio activo. La prueba de disolución se ha llevado a cabo en la industria farmacéutica durante muchos años, en este proceso la introducción de abordajes como la calidad por diseño, ha abierto la puerta para la búsqueda de pruebas que permitan predecir el comportamiento de un fármaco durante su vida útil. La disolución intrínseca representa una prueba más específica para la caracterización de los fármacos que permite determinar estrategias de formulación y procesos con mayor detalle. Sin embargo, su uso en la industria farmacéutica está limitado, tanto en el desarrollo farmacéutico como en el control de calidad de principios activos. Su inclusión en los métodos compendiales y monografías de productos podría ser útil para la evaluación lote a lote de principios activos farmacéuticos, que permitiría mayor seguridad y eficacia de los medicamentos.

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* mortizr@uaemex.mx

## INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años se ha registrado un amplio desarrollo de medicamentos que permiten tratar con mayor eficacia y seguridad las enfermedades; así condiciones que eran fatales han dejado de serlo (Bayona y Fajardo, 2012). Las entidades regulatorias requieren que todos los medicamentos cumplan con estrictas evaluaciones de identidad, potencia y pureza, con pruebas que reflejen con precisión su calidad y desempeño (Banker y Rhodes, 2002). Por ello, el desarrollo y validación de técnicas analíticas es un área relevante en la industria farmacéutica (IF).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015 Estabilidad de Fármacos y Medicamentos, así como de Remedios Herbolarios, un medicamento es “toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga un efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en una forma farmacéutica y que se identifica por sus propiedades” (Secretaría de Salud, 2005).

La evaluación de la calidad y desempeño de un medicamento se realiza bajo tres rubros principales: a) el biológico, donde se verifica la potencia microbiológica (en el caso de antibióticos), la eficacia de los conservadores y cuenta microbiana (Aulton, 2004); b) el fisicoquímico (Ramos y Baltazar, 2009), que puede involucrar pruebas inmediatas o a largo plazo. Las pruebas inmediatas pueden incluir tamaño y forma, espesor de tabletas, identificación, color, potencia, uniformidad de contenido, variación de peso, dureza y desintegración, mientras que las pruebas a largo plazo incluyen estudios de estabilidad (Lieberman, Lachman y Schwartz, 2007), que es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil (Secretaría de Salud, 2005); c) el biofarmacéutico, siendo la disolución la prueba *in vitro* más utilizada en la IF (FEUM, 2014b).

En el presente capítulo se realiza una revisión de publicaciones en donde se ha abordado el concepto de disolución intrínseca, así como sus aplicaciones en la investigación y desarrollo de medicamentos sólidos orales (MSO).

## Solubilidad y disolución de fármacos y medicamentos

La solubilidad es una de las propiedades fisicoquímicas más importantes de un fármaco, ya que es uno de los factores que influyen en su absorción vía oral. Para que un fármaco administrado por vía oral pueda ser absorbido es necesario que tenga una adecuada solubilidad en el tracto gastrointestinal (Kaur, Narang, y Bansal, 2018).

La solubilidad se define como la cantidad de soluto que puede ser disuelto en un volumen de solvente a una temperatura determinada. Es un proceso termodinámico que está controlado por las energías de solvatación y de la red cristalina (Kaur et al., 2018; Nicoud, Licordari y Myerson, 2018). La solubilidad depende de varios factores tanto del medio como del fármaco, tales como el pH, el estado de ionización, el polimorfismo y la superficie de área (Souza, Souza, Maria y Castro, 2018). Al proceso en el que las moléculas o iones del soluto pasan del estado sólido a una solución se le conoce como disolución, y la velocidad a la que este proceso se logra se denomina velocidad de disolución. Por lo tanto, la solubilidad es un concepto relativo al equilibrio fisicoquímico, mientras que la disolución es un fenómeno cinético (Kaur et al., 2018; Rao, Sanghvi y Zhu, 2009). Todos estos conceptos son de mucha importancia en el desarrollo y evaluación de los medicamentos, porque están relacionados con los mecanismos y velocidades de liberación y absorción de los fármacos.

En las farmacopeas reconocidas a nivel internacional está descrita la prueba llamada disolución, que es un método *in vitro* para medir la velocidad a la que se libera un fármaco de una forma farmacéutica sólida, en condiciones controladas (FEUM, 2014a; Jacob y Nair, 2018). Las aplicaciones de la prueba de disolución son distintas a lo largo del ciclo de vida de los MSO. En las fases de estudios clínicos, la prueba se utiliza para conocer la liberación (solubilización y cuantificación) del fármaco de manera *in vitro*, así como determinar un método que proporcione correlación *in vivo-in vitro* (CIVIV) o cualquier otra información biorrelevante. Una vez obtenido el registro legal del medicamento, la principal función de la prueba es la de evaluar la calidad del producto en el área de Control de Calidad, para determinar la consistencia del proceso de fabricación y el cumplimiento de especificaciones del producto terminado (Brown et al., 2005; Friedel et al., 2018). Incluso los estudios de disolución pueden apoyar la evaluación de los cambios en el sitio de producción, el proceso de fabricación o la formulación (Friedel et al., 2018).

La disolución puede reducir el número de estudios de biodisponibilidad con fines de bioequivalencia en productos genéricos, en tanto aporta información valiosa durante los estudios de preformulación de formas farmacéuticas (Brown et al., 2005; Carrión Recio, González Delgado, Olivera Ruano y Correa Fernández, 1999; Fotaki, 2011; Shekunov y Montgomery, 2016; Uddin, Saffoon y Sutradhar, 2011).

El mecanismo de disolución para MSO de liberación inmediata requiere, al menos, de la erosión lo desintegración de la forma farmacéutica; es decir, la liberación del fármaco de la matriz de formulación, seguida por la solubilización del fármaco en el medio de prueba. La tasa global de disolución depende de la más lenta de estas dos etapas (Brown et al., 2005; Phillips, Pygall, Cooper y Mann, 2012).

Si la erosión lo desintegración de la matriz es la etapa limitante de la velocidad de disolución, entonces se dice que la velocidad de disolución es controlada por la desintegración (o erosión, en su caso); si la solubilización de las partículas de fármaco es la etapa limitante de la velocidad de disolución, se dice que la velocidad está controlada por la disolución intrínseca (Brown et al., 2005; Phillips et al., 2012); este concepto se aborda más adelante.

Para garantizar el buen desempeño de la prueba de disolución deben tenerse en cuenta las condiciones de insaturación (conocidas como condiciones *sink*) durante el estudio. El término se refiere a que el volumen de medio sea al menos tres veces el volumen requerido para formar una solución saturada del fármaco (Brown et al., 2005; Friedel et al., 2018; Phillips et al., 2012), aunque otros autores consideran que puede ser hasta diez veces el volumen necesario para la saturación. Si no se cumplen las condiciones de insaturación, la concentración del principio activo farmacéutico (PA) los resultados de la prueba podrían no ser confiables (Brown et al., 2005). Según la Guía para las Pruebas de Disolución de los Productos Sólidos Orales de la Federación Internacional Farmacéutica (FIP), dado que las condiciones *sink per se* no garantizan asociaciones *in vivo-in vitro*, y siendo que en algunos casos pueden obtenerse perfiles de disolución confiables violando las condiciones *sink*, deben conducirse estudios específicos para cada fármaco y condiciones de prueba que demuestre que un método *in vitro* dado es aceptable para obtener resultados biofarmacéuticamente relevantes (FIP, 1997).

En combinación con la permeabilidad, la prueba farmacopeica de disolución es un indicador de la absorción de un fármaco, y de hecho ambos parámetros son utilizados para clasificar a los fármacos mediante el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

(SCB) introducido por Gordon Amidon en 1995 (González Casado, 2015). Así, la magnitud y velocidad con la que se lleva a cabo la absorción del fármaco (Aulton, 2004) determina primariamente la biodisponibilidad del fármaco administrado de forma oral (Rao et al., 2009). La conexión entre la prueba de disolución y el desempeño *in vivo* está basada en el hecho de que antes de que un fármaco pueda absorberse, primero deber ser disuelto en el contenido acuoso del tracto gastrointestinal (Souza et al., 2018; Uddin et al., 2011). En la IF el desarrollo de un medicamento inicia con una serie de consideraciones, dentro de las cuales está el SCB de un fármaco para tomar decisiones relativas a la vía de administración, dosis, elección de la forma farmacéutica y su formulación y operaciones unitarias necesarias en el proceso de fabricación. Por ejemplo, un fármaco clase I puede formularse como una tableta de liberación inmediata convencional, y esta forma farmacéutica también puede ser útil para un PA clase III si se incluyen mejoradores de solubilidad en la fórmula. Por otro lado, para mejorar la solubilidad (y por lo tanto la tasa de absorción), un PA clase II necesita de otras estrategias como el uso de dispersiones sólidas amorfas, la modificación del cristal, formación de cocrystalos, reducción de tamaño de partícula o complejación (con ciclodextrinas, por ejemplo), entre otras. Para un PA clase IV tal vez se requiera alguna de las estrategias de formulación aptas para un PA clase II en combinación de la inclusión de mejoradores de la absorción en la fórmula (Sandri, Bonferoni, Rossi, Caramella y Ferrari, 2018).

A la relación entre la prueba de disolución y la absorción *in vivo* de un medicamento se le conoce como CIVIV (Carrión Recio et al., 1999; Jacob y Nair, 2018). Para que esta relación sea aceptable se requieren varias condiciones, como que la disolución *in vitro* y el comportamiento de disolución o liberación *in vivo* de una forma farmacéutica sea similar o tenga una relación escalable entre sí (Cardot y Davit, 2012). Esta correlación es difícil de lograr (Gibaldi y Feldman, 1967; Jacob y Nair, 2018), ya que la prueba de disolución no considera un proceso biofarmacéutico real de absorción, distribución y eliminación, por lo que las condiciones de insaturación deben verificarse en todo momento.

La prueba de disolución aporta información sobre las variables que afectan la tasa de disolución. Éstas pueden incluir características del PA como la identidad, solubilidad, tamaño de partícula, forma y arreglo cristalino y densidad aparente, así como de la composición del medicamento, como la concentración de fármaco, tipo y porcentaje de excipientes y proceso de manufactura, también como los efectos de

las condiciones de almacenamiento que podrían alterar la estabilidad del producto (Brown et al., 2005).

### *Aparatos de disolución*

La prueba de disolución se lleva a cabo en distintos aparatos, de los cuales los más utilizados se encuentran referenciados en las principales farmacopeas del mundo. En estos textos de carácter obligatorio están documentados siete diferentes aparatos (Adeyeye y Brittain, 2008).

El aparato I, también conocido como canasta, es oficial desde 1970 y es útil para analizar formas farmacéuticas flotantes, sólidos, perlas (Adeyeye y Brittain, 2008; FEUM, 2014b), cápsulas, sistemas monodispersos y polidispersos (Uddin et al., 2011), supositorios y sistemas de liberación modificada (Adeyeye y Brittain, 2008; FEUM, 2014b; Long y Chen, 2009).

El aparato II, conocido como paletas, fue incluido en la USP (por sus siglas en inglés, United States Pharmacopoeia), en 1975, y es usado para evaluar formas farmacéuticas que pueden sumergirse espontáneamente (Adeyeye y Brittain, 2008; FEUM, 2014b; Long y Chen, 2009), sistemas monodispersos y polidispersos, tabletas y cápsulas, además de suspensiones (Uddin et al., 2011). Se usa para formas de liberación inmediata y modificada (Adeyeye y Brittain, 2008; FEUM, 2014b).

En la figura 1 se muestran los esquemas de los aparatos I y II. Ambos son ampliamente utilizados debido a que se encuentran estandarizados y son métodos robustos y fáciles de operar. Sus principales desventajas son que el volumen de medio a utilizar es limitado, por lo que no se logra una simulación del tránsito gastrointestinal, y que no son conocidas las condiciones hidrodinámicas (Uddin et al., 2011).

El aparato III, conocido como cilindro reciprocante, apareció en 1995, y fue diseñado específicamente para sistemas de liberación extendida o modificada (Adeyeye y Brittain, 2008). Este aparato permite el cambio de medio para simular un gradiente de concentración, es útil principalmente para formas no desintegrantes y para perlas (Long y Chen, 2009; Uddin et al., 2011).

En la figura 1 se presenta un esquema de este aparato. Las principales ventajas del aparato III son el cambio rápido de medio, que se pueden programar diferentes cambios de medio y que los gradientes simulan el tránsito y los cambios en el tracto

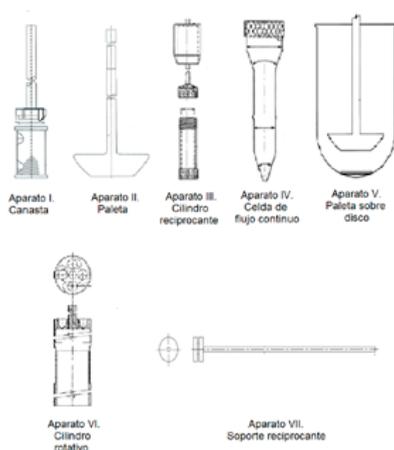
gastrointestinal. Sus principales desventajas son que el volumen de medio es muy pequeño y que el uso de surfactante genera espuma, la cual interfiere en la prueba (Uddin et al., 2011).

El aparato IV o celda de flujo continuo (CFC), apareció en la USP en 1995 y fue diseñado para sistemas de liberación no desintegrantes. Puede operar bajo diferentes condiciones, como los sistemas abierto o cerrado (recirculante), diferentes velocidades de flujo y temperaturas (Adeyeye y Brittain, 2008; Long y Chen, 2009).

En la figura 1 podemos observar un esquema de la CFC que por la diversidad de celdas disponibles permite su aplicación en un amplio intervalo de formas farmacéuticas, incluyendo tabletas, polvos, supositorios, cápsulas de gelatina blanda y dura, implantes, gránulos y suspensiones. Es el aparato de elección para sistemas de liberación modificada y productos poco solubles (Uddin et al., 2011).

El aparato V, denominado paletas sobre disco, es una modificación del aparato II con un disco de acero en el fondo que sirve de soporte para colocar el sistema de liberación. Fue diseñado originalmente para parches transdérmicos. El aparato VI o cilindro rotativo, es una modificación del aparato I, pero en lugar de una canastilla, es colocado un cilindro. Fue diseñado también para parches transdérmicos (Adeyeye y Brittain, 2008; Long y Chen, 2009; Uddin et al., 2011). Por último, el aparato VII o soporte reciprocante, usado para parches transdérmicos, bombas osmóticas y sistemas de liberación de baja dosis (Adeyeye y Brittain, 2008; Long y Chen, 2009; Uddin et al., 2011).

**Figura 1. Aparatos de disolución farmacopeicos**



Fuente: modificado de USP.

En la IF la elección de los aparatos antes citados se basa en si están o no citadas en las monografías de los productos terminados. Si la prueba tiene como objetivo el control de la calidad lote a lote, y está incluida en una farmacopea reconocida, será utilizada con regularidad por un laboratorio farmacéutico. Este suele ser el caso de los aparatos I y II. Para el caso del desarrollo de un nuevo producto, los aparatos menos populares pueden ser de especial interés porque aportan información detallada sobre la liberación de un PA. Sin embargo, no siempre son utilizados porque, al no ser de uso obligatorio, no se justifica la inversión en la compra de estos equipos. Tal es el caso del aparato IV, que se ha perfilado como un instrumento útil debido a la versatilidad que le dan sus diferentes configuraciones, que permiten el análisis de distintas formas farmacéuticas de distintos tamaños e incluso el análisis de polvos, mezclas o granulados. Asimismo, su popularidad entre los laboratorios fabricantes de medicamentos genéricos ha ido incrementando, ya que permite determinar con mayor precisión los factores de similitud (F2) requeridos en la evaluación *in vitro* previa al estudio clínico de estos productos. Por otro lado, su funcionamiento también es atractivo para evaluar la consistencia lote a lote de insumos farmacéuticos, especialmente de un PA.

### Métodos para determinación de solubilidad

Como se ha dicho, la solubilidad de un PA es una de sus propiedades farmacéuticas más importantes. La solubilidad está relacionada con el proceso de cristalización empleado en la fabricación del fármaco, y es determinante en el desempeño de los MSO por su afectación directa en la absorción y biodisponibilidad del fármaco, ya que tras la administración oral el PA debe estar en forma de solución acuosa, independientemente del mecanismo de absorción (Nicoud et al., 2018; Souza et al., 2018). Las características del estado sólido determinan la solubilidad de un PA. Se han publicado estudios en los que se efectúa la evaluación de la entalpía de disolución que son importantes para conocer el mecanismo de solubilización de los fármacos. Estos estudios están fuera del alcance de esta revisión, pero pueden consultarse, por ejemplo: (Barzegar Jalali, Rahimpour, y Martinez, 2017; Jouyban, Abbasi y Rahimpour, 2017; Lytkin et al., 2018).

La determinación de la solubilidad se puede llevar a cabo por dos tipos de estudios; uno de ellos es el isotérmico, donde se agrega un exceso de soluto al solvente a una temperatura dada en contenedores sellados herméticamente y se

agita hasta lograr el equilibrio. El tiempo en que esto se logra depende de varios, factores como la estructura y tamaño del cristal, el disolvente, la temperatura y la velocidad de agitación; de manera general 24 horas son suficientes a una agitación vigorosa finalmente la concentración de soluto se determina por una técnica analítica adecuada (Ploger, Hofs y Dressman, 2018; Glomme y Dressman, 2005; Nicoud et al., 2018; Souza et al., 2018). Este método, conocido como solubilidad en equilibrio, es recomendado por varias entidades regulatorias internacionales como la Food and Drug Administration, FDA, la European Medicines Agency (EMA) y la Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) (Souza et al., 2018). La disolución intrínseca es un método aceptado por la USP para la determinación de la solubilidad, por lo que es relevante a nivel internacional. Dada su importancia, este método se describe en el siguiente apartado.

Otros métodos no farmacopeicos para determinar la solubilidad son la titulación potenciométrica ácido-base y el método no isotérmico. El primero se basa en un cambio característico o inflexión de la curva de titulación causada por la precipitación del analito; la curva de titulación potenciométrica se obtiene representando el valor del pH contra el volumen consumido de ácido/base (Glomme y Dressman, 2005). En el método no isotérmico, una masa conocida de soluto se equilibra con una masa conocida de solvente a una temperatura dada, y la temperatura aumenta progresivamente mientras se agita la suspensión. Un factor determinante en este estudio es lograr una determinación adecuada de la temperatura de saturación, por lo que es esencial emplear una rampa de temperatura tan lenta como permita estar lo más cerca posible del equilibrio (Nicoud et al., 2018).

### Disolución intrínseca (DI)

Históricamente la etapa de preformulación de una forma farmacéutica, consiste principalmente en determinar el perfil de una sustancia farmacológica, es decir, su caracterización, además de estudios de compatibilidad con excipientes y de estabilidad. Estos estudios incluyen el cálculo del pKa, solubilidad y DI, coeficiente de partición, ensayo, perfil de flujo, difracción de rayos X, técnicas calorimétricas, distribución de tamaño de partícula, forma de la partícula, y todas aquellas pruebas que nos permitan predecir el comportamiento de la molécula en estudio, para determinar la

forma farmacéutica e incluso las técnicas de análisis apropiadas a esta caracterización (Adeyeye y Brittain, 2008; Aulton, 2004).

La disolución de una forma farmacéutica está influenciada por la solubilidad y la disolución intrínseca de los PA. Ambos son parámetros útiles dentro de los estudios de preformulación de una forma farmacéutica (Adeyeye y Brittain, 2008; Aulton, 2004). Sin embargo, la disolución intrínseca no se lleva a cabo rutinariamente durante el control de calidad de una materia prima, porque no está descrita en las monografías individuales de los insumos farmacéuticos, como se discute más adelante.

La velocidad de disolución intrínseca (VDI) se define como la velocidad de disolución de un fármaco con condiciones constantes de área de superficie, velocidad de agitación, pH y fuerza iónica del medio de disolución (Souza et al., 2018; USP, 2012; Viegas, Curatella, Vanwinkle y Brinker, 2001). En otras palabras, es la tasa de masa transferida desde la superficie sólida (de la matriz) a la fase líquida (medio) (Souza et al., 2018). En algunos estudios que se exponen más adelante se ha sugerido que la VDI se puede utilizar en lugar del método de solubilidad en equilibrio para fines de la clasificación de medicamentos de acuerdo con el SCB.

La VDI fue descrita por primera vez por John Wood en 1963, en un equipo que actualmente lleva su nombre y que se encuentra descrito en las farmacopeas internacionales, tales como la USP (Agilent, 2010), la Farmacopea Británica (BP, por sus siglas en inglés British Pharmacopeia) y Farmacopea Europea (EP, European Pharmacopeia).

La VDI ha sido usada para caracterizar los fármacos sólidos desde hace varios años (Zakeri Milani, Barzegar Jalali, Azimi y Valizadeh, 2009) y es una manera de demostrar su pureza y equivalencia (Tacey, Viegas Lise, Van Winkle Brinker, 2001). Sin embargo, como desventajas está que un amplio abanico de propiedades puede afectar los resultados, como por ejemplo la forma y el tamaño de partícula del PA y la presencia de polimorfismo o amorfismo (Avdeef y Tsinman, 2008).

Algunos autores han sugerido que las principales variables de respuesta relacionadas con la absorción de un fármaco son la VDI y la solubilidad, ya que ambos parámetros son altamente dependientes del pH y su influencia en el proceso de absorción puede determinarse por el intervalo de pH del tracto gastrointestinal (Issa y Ferraz, 2011; Skinner y Kanfer, 1992).

En términos cuantitativos, la VDI se calcula por la ecuación 1:

$$VDI = (dm/dt)_{\max} / A \quad (1)$$

Donde:

VDI: es la velocidad de disolución intrínseca en  $mg/min \cdot cm^2$

A: es el área del disco de fármaco en  $cm^2$  que permite que durante la prueba ésta permanezca constante

m: es la masa del fármaco en mg

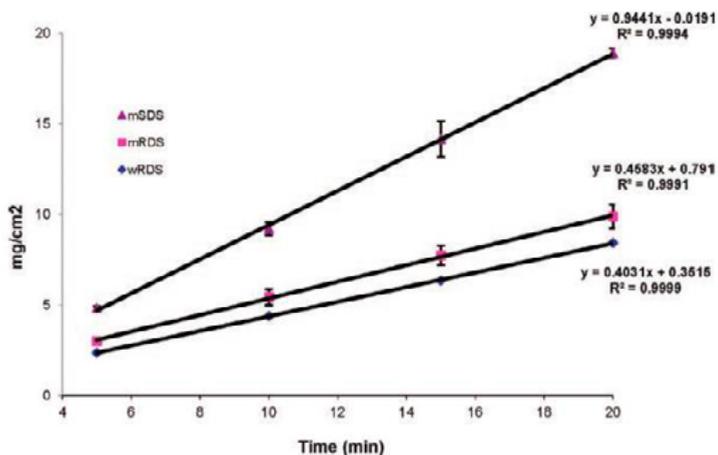
t: el tiempo en minutos

$(dm/dt)_{\max}$  = es la pendiente máxima en la curva de disolución

Fuente: modificado de USP.

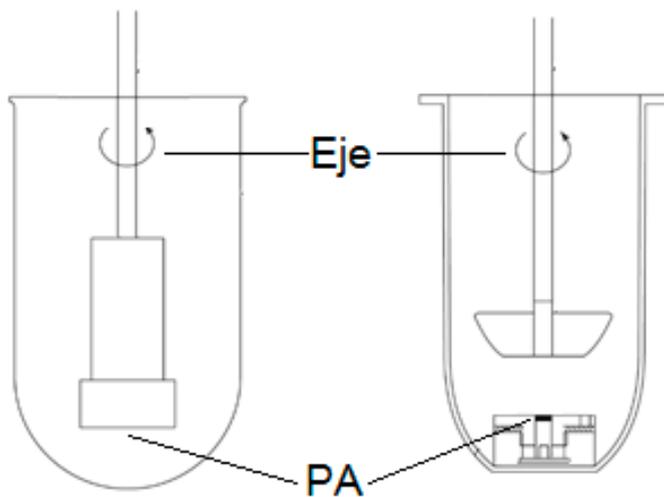
La VDI puede ser obtenida empleando diferentes dispositivos, donde el fármaco es comprimido como un disco, con ayuda de un punzón y una matriz. Se utiliza un medio de disolución determinado y se cuantifica la cantidad de fármaco disuelto a intervalos definidos de tiempo. Luego, se realiza un gráfico de la cantidad acumulada de fármaco disuelto con respecto al tiempo y una regresión lineal. La velocidad de disolución en unidades de masa por segundo es representada por la pendiente de la ecuación lineal, como se muestra en el ejemplo de la figura 2. La VDI se obtiene dividiendo el valor de la pendiente por la superficie de área del comprimido preparado, y es reportada en unidades de masa  $cm^{-2} \cdot sec^{-1}$  (Issa y Ferraz, 2011). Para determinar la VDI puede utilizarse el aparato de Wood o bien el disco estacionario, sus esquemas se muestran en la figura 3. Su uso está descrito en las farmacopeas internacionales, que se revisarán más adelante.

Figura 2. Ejemplo de perfiles o curvas de disolución intrínseca para cloranfenicol



Fuente: Tseng, Patel y Zhao, 2014.

Figura 3. Aparatos para disolución intrínseca. Disco rotatorio o aparato de Wood (izquierda) y disco estacionario (derecha)



Fuente: modificado de USP.

Una parte importante en el desarrollo de la prueba es la compactación del PA para obtener los comprimidos de área constante. Este paso puede ser la mayor fuente de error, pues se sabe que la compactación puede tener un efecto en la forma de la partícula del PA. Cuando el hábito de cristal controla la velocidad de disolución intrínseca, la compactación del sólido para formar un disco de área uniforme destruye el hábito de las partículas individuales y nulifica el sentido de comparar su VDI. Por otra parte, si la energía del cristal controla la velocidad de disolución, las diferencias en la VDI pueden ser todavía evidentes, pero es posible que sean atenuadas a diferentes grados, dependiendo de las condiciones de cristalización, incluyendo la naturaleza y concentración del aditivo. Por esta razón, es necesario verificar el estado sólido al momento de realizar la compactación (Chan y Grant, 1989). Una de las principales ventajas de la prueba es la cantidad de material requerida para llevar a cabo este ensayo, ya que es mucho menor que la requerida para el ensayo de solubilidad en equilibrio y la posible interferencia en los resultados por factores tales como la transición desde la estructura cristalina o la formación de sales puede determinarse por la presencia de curvaturas en el gráficos obtenidos (Issa y Ferraz, 2011).

En la figura 4, se muestran las partes del aparato de Wood, que consta de un eje con un soporte cilíndrico ensamblado a una matriz con un punzón dentro de la cual se realiza la compactación del material en prensa hidráulica. El procedimiento inicia cuando se ensambla la base de tres orificios a la matriz; esto se hace colocando tres tornillos en los orificios destinados para ello (figura 4a). Una vez ensamblada se coloca dentro de la matriz la cantidad de muestra requerida para el ensayo (figura 4b) y se deja caer el punzón superior sobre la muestra (figura 4c). Se traslada la matriz con el punzón a la prensa hidráulica y se elige la presión deseada (figura 4d), se retira de la prensa y se retira el punzón con ayuda de la varilla auxiliar (figura 4e). Por último, se coloca el eje, enroscando el mismo sobre la matriz (figura 4f) y se retira la placa inferior retirando los tornillos colocados de manera inicial. Finalmente, el dispositivo ya ensamblado con la muestra se coloca dentro del disolutor como se aprecia en la figura 4g.

Figura 4. Aparato de Wood

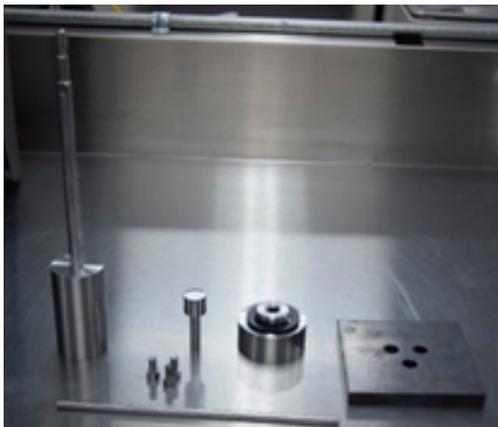


Figura 4a



Figura 4b

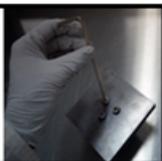


Figura 4c



Figura 4d



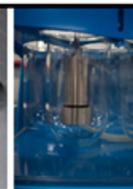
Figura 4e



Figura 4f



Figura 4g



Elaboración propia.

*Descripción de la prueba de “disolución intrínseca” y comparación de métodos de prueba de acuerdo a farmacopeas internacionales*

En las farmacopeas internacionales se encuentran distintas definiciones para nombrar esta técnica; para la USP, el nombre utilizado es “disolución intrínseca aparente”, mientras que para las farmacopeas Europea y Británica es “disolución intrínseca”. En todos los casos se refieren a las pruebas realizadas con el disco rotatorio; sólo en la USP

se menciona el disco estacionario. Sin embargo en las farmacopeas europea y británica se da también el concepto de “disolución aparente” haciendo referencia a la disolución del fármaco puro a través de la CFC.

De acuerdo a la USP, la VDI es la determinación de la velocidad de disolución de comprimidos no desintegrantes con un área superficial constante expuesta a un medio de disolución. La VDI está influenciada por las propiedades intrínsecas del estado sólido, como son estado de cristalinidad (NHS, 2017; USP, 2012), hábito cristalino, amorfismo, polimorfismo, pseudopolimorfismo, tamaño de partícula y superficie de área específica (NHS, 2017; Pharmacopoeia y The, 2008); así como el efecto de las impurezas asociadas con un material. De manera extrínseca la VDI está influenciada por el área superficial, la hidrodinámica y las propiedades del medio de disolución, incluyendo el disolvente, la presencia de tensoactivos, temperatura, viscosidad, pH, tipo y fuerza del buffer, y puede llevarse a cabo para la caracterización tanto de un PA como de excipientes (NHS, 2017; USP, 2012). Por ejemplo, el efecto del pH microambiental en la velocidad de disolución y la absorción oral ha sido estudiado por algunos autores en casos de estudio particulares (Hou et al., 2018).

La preparación del comprimido se realiza pesando una cantidad de material necesaria. La USP recomienda la compresión durante 1 minuto a 15 MPa en una prensa hidráulica; sin embargo, cualquier otra alternativa puede ser utilizada si se justifica adecuadamente. Además durante la compresión se debe evitar la formación de capilares. En la BP se indica que la preparación del comprimido debe ser bajo nula o mínima porosidad (NHS, 2017). Incluso en la monografía de la USP se indica la necesidad de comprobar la forma del estado sólido después de la compresión. La desintegración del comprimido debe prevenirse, ya que ésta causaría el incremento de la disolución y la VDI se vería aumentada (Pharmacopoeia y The, 2008). En cualquier caso, debe comprobarse por alguna técnica especializada, que la compresión no genera cambios en la forma cristalina. Debe removerse del comprimido el polvo remanente en la superficie empleando aire comprimido o nitrógeno (NHS, 2017; USP, 2012).

De acuerdo a la USP, BP y EP la VDI está dada como la masa de soluto por unidad de tiempo por área expuesta ( $\text{masa}/\text{s}^2\text{cm}^2$ ); sin embargo este último término en la USP también está definido como el “flujo de disolución” (NHS, 2017; Pharmacopoeia y The, 2008; USP, 2012).

La selección del medio para llevar a cabo la prueba es muy importante y como se mencionó para la prueba de disolución, la valoración debe hacerse en condiciones

de insaturación. Para lograr una mejor aproximación a las condiciones *in vivo*, la evaluación puede llevarse a cabo en pH fisiológico a 37 °C, además puede utilizarse para determinar la solubilidad del sólido que se está probando. Como en toda prueba de disolución, es necesario utilizar medio degasificado, para evitar la formación de burbujas en la superficie del comprimido o de la matriz, que puedan alterar el resultado (USP, 2012). Las características del medio pueden afectar la VDI; una importante asunción en este método es que el pH de la superficie del comprimido es el mismo que el del medio de disolución; sin embargo, el pH debe ser controlado con compuestos ionizables, ya que la VDI depende fuertemente de él. En contraparte, para compuestos no ionizables el tipo y concentración del buffer no poseen una dependencia significativa. Para fármacos que son ácidos y bases, el soluto puede alterar el pH, y en la superficie del comprimido éste podría ser ligeramente diferente. Para ácidos débiles el pH del medio de disolución puede estar de 1 a 2 unidades por debajo del pKa del material a disolver y de manera contraria para bases débiles (USP, 2012).

El análisis de datos se realiza graficando la cantidad acumulada de soluto disuelto contra el tiempo, aplicando una regresión lineal en los puntos iniciales de la región lineal de la curva. La pendiente obtenida corresponde al valor de la VDI. El flujo de disolución es calculado obteniendo el cociente de la velocidad de disolución y la superficie de área del comprimido (NHS, 2017; Pharmacopoeia y The, 2008; USP, 2012). La gráfica obtenida puede mostrarse como una curva con una inflexión hacia arriba, lo cual indicará un problema en el sistema experimental que puede estar relacionado con la degradación del comprimido, delaminación o desintegración; en caso contrario, cuando la inflexión es hacia abajo puede indicar una transformación de la forma sólida o la saturación del medio (USP, 2012).

Las principales diferencias de las monografías estudiadas, se encuentran simplificadas en la tabla 1.

Tabla 1. Comparativo de las monografías de disolución intrínseca incluidas en diversas farmacopeas internacionales

Técnica	USP 2016	BP 2017	EP 2014	FEUM 2014	Farmacopea China 2015	Farmacopea India 2014
¿Incluida?	SI*	SI*	SI*	No*		
Nombre oficial de la prueba	Disolución intrínseca aparente	Disolución intrínseca	Disolución intrínseca			
Partes de la monografía	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Información general</li> <li>2. Procedimiento experimental               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Preparación del compacto</li> <li>b. Medio de disolución</li> <li>c. Aparatos                   <ol style="list-style-type: none"> <li>i. Disco rotatorio</li> <li>ii. Disco estacionario</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>3. Análisis de datos e interpretación</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Información general</li> <li>2. Principio</li> <li>3. Procedimiento               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Preparación del compacto</li> <li>b. Aparatos                   <ol style="list-style-type: none"> <li>i. Disco rotatorio</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>4. Evaluación de resultados</li> <li>5. Nota: Justificar el uso de equipos fijos</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Información general</li> <li>2. Principio</li> <li>3. Procedimiento               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Preparación del compacto</li> <li>b. Aparatos                   <ol style="list-style-type: none"> <li>i. Disco rotatorio</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>4. Evaluación de resultados</li> <li>5. Nota: Justificar el uso de equipos fijos</li> </ol>	No aplica		
Observaciones	a. Se indica en la preparación del compacto la presión recomendada y el tiempo de compresión b. Durante la compresión pueden ocurrir cambio en la forma cristalina, por lo que debería confirmarse la forma del estado sólido.	a. No se indica tiempo ni presión para la preparación del compacto b. No indica que se requiera confirmación de la forma del estado sólido	a. No se indica tiempo ni presión para la preparación del compacto b. No indica que se requiera confirmación de la forma del estado sólido			
Equipos	Disco estacionario Disco rotatorio	Disco rotatorio	Disco rotatorio			
Disolución aparente	NO	SI Celda de flujo continuo	SI Celda de flujo continuo			

Elaboración propia.

Debido a que esta prueba requiere la formación de un comprimido que puede comprometer el estado sólido del PA puro, que es difícil de verificar en tiempo real, está documentada como alternativa la evaluación de la velocidad de disolución del fármaco puro con la CFC, denominada disolución aparente (EDQM European Directorate for the Quality of Medicines, 2008; NHS, 2017).

El aparato IV consta de un depósito, una bomba, la CFC y un baño hidrotérmico. El depósito contiene el medio de disolución que luego pasa a través de la celda (Mcdonnell, Crane y Redmond, 2017). El diseño básico de la celda es un cilindro vertical con una parte cónica en la parte inferior, su llenado con perlas de vidrio de 1 mm que produce condiciones de flujo laminar (Greco, Bergman y Bogner, 2011). Las celdas compendiales son de 12 y 22.6 mm de diámetro. Existen otros diseños para evaluar supositorios, polvos, implantes (Brown, 2005) cápsulas de gelatina dura y blanda, semisólidos y *stents* (Fotaki, 2011). Una ventaja de la CFC requiere bajo volumen de medio, tiene la capacidad de mantener las condiciones de insaturación y presenta facilidad para cambiar los medios de disolución (Kakhi, 2009). La CFC

puede ser utilizada para la caracterización de la disolución aparente de polvos, con la ventaja de que no requiere la aplicación de una fuerza mecánica de compresión, lo que disminuye la probabilidad de que ocurra un cambio de fase sólida y por lo tanto evita tener que descartarlo (Fotaki, 2011). Las disoluciones intrínseca y aparente son pruebas que la IF no ha explotado, y su uso se ha dado mayormente en fases tempranas del desarrollo farmacéutico como prueba de caracterización de fármacos, especialmente en etapas de preformulación preclínica. Un área inexplorada de estas pruebas es el control de calidad del PA, por ejemplo para determinar su consistencia lote a lote y prevenir la variabilidad de los insumos que se procesan para la fabricación de medicamentos.

#### Efecto de las propiedades del estado sólido en la VDI

El estado sólido es el más importante estado de la materia en el desarrollo farmacéutico, pues la mayoría de las formulaciones son desarrolladas como formas farmacéuticas sólidas debido a su capacidad de cristalizar, a su fácil manejo y mejor estabilidad química en comparación con los líquidos (Zhang y Zhou, 2009).

La capacidad de una sustancia de existir como dos o más fases cristalinas que tienen diferentes arreglos o conformaciones de las moléculas en una red cristalina o hábito cristalino, es llamada polimorfismo y de forma correspondiente los diferentes sólidos, son llamados polimorfos (Zhang y Zhou, 2009). Los polimorfos tienen la misma composición química pero diferente estructura interna, por lo que poseen diferentes propiedades fisicoquímicas (Vippagunta, Brittain y Grant, 2001), y las propiedades mecánicas y químicas pueden variar significativamente. La disposición de las moléculas en un cristal define sus propiedades fisicoquímicas, afecta sus propiedades de flujo, así como la compactibilidad, la fuerza de ruptura y la desintegración de una tableta fabricada con esa molécula, la velocidad y comportamiento de disolución, estabilidad química, en consecuencia determinan el rendimiento del PA en la forma farmacéutica final, es decir, repercute en el desempeño del proceso de fabricación de formas farmacéuticas (Bukovec, Meden, Smrkolj y Vrečer, 2015; Kuminek et al., 2013; Raghavan, Ristic, Sheen y Sherwood, 2002).

En la IF la caracterización del estado sólido de un PA juega un papel importante en el desarrollo de medicamentos debido a que aporta información que tiene implicaciones

en las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del producto final. Sin embargo, no se ha popularizado el uso de algunos aparatos de disolución para la evaluación de estos insumos; de hecho con relativa frecuencia se ignora que la caracterización y la comprensión de las propiedades sólidas son esenciales para el control de calidad de los productos farmacéuticos (Kuminek et al., 2013). En este sentido, debe replantearse la utilidad de aparatos como la CFC para la evaluación de materias primas y otros insumos farmacéuticos.

### Aplicaciones de la VDI

Durante la revisión bibliográfica se encontró la aplicación de la VDI en trabajos sobre temas como la caracterización de principios activos nuevos o polimorfos, en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, en modificaciones de la técnica para necesidad especiales, así como en trabajos para comparar las técnicas existentes (disco rotativo o estacionario) o nuevas técnicas (CFC). En esta sección revisaremos algunos ejemplos sobre estos trabajos.

#### *Caracterización de principios activos farmacéuticos*

En un estudio de Bartolomei y colaboradores, se llevó a cabo la comparación de polimorfos y sus efectos en la velocidad de disolución intrínseca de diclofenaco sódico. Realizaron estudios de dos formas cristalinas de diclofenaco, incluyendo disolución intrínseca por disco estacionario. Encontraron que la forma anhidra (forma comercial) tenía una disolución más rápida y una solubilidad más alta, lo que puede representar diferencias en la biodisponibilidad, cuando la disolución es el paso limitante (Bartolomei, Bertocchi, Antoniella y Rodomonte, 2006). Otros autores como Šehić, S. y su equipo compararon varias formas de carbamazepina encontrando diferencias en la VDI entre los distintos polimorfos. Incluso proponen brevemente el uso de la VDI como parte del control de calidad de la materia prima (Šehić, Betz, Hadžidedić, El-Arini y Leuenberger, 2010), ya que de manera rutinaria no se encuentra referenciada en las monografías farmacopeicas utilizadas por la industria para la evaluación de un PA; sin embargo, al ser una prueba tan dependiente de las propiedades de los

materiales puede ser una herramienta útil para monitorear su calidad lote a lote, no sólo en la IF, también en la industria farmoquímica.

Durante el desarrollo o uso de nuevas técnicas para mejorar la solubilidad de fármacos, el uso de la técnica de disolución intrínseca es de gran utilidad, ya que permite comparar en qué medida se puede mejorar la disolución. Charoenchaitrakool y colaboradores mostraron un método para micronizar ibuprofeno por expansión de soluciones supercríticas. Al obtener el producto micronizado se emplearon diferentes técnicas de caracterización; sin embargo, la de principal interés fue la disolución intrínseca como indicador de que, al reducir el tamaño de partícula logran mejorar la disolución hasta cinco veces por encima del activo sin el tratamiento (Charoenchaitrakool y Dehghani, 2000).

### *Desarrollo de nuevas formas farmacéuticas*

Está referenciado en la literatura el impacto que tienen diferentes preparaciones farmacéuticas en la VDI; por ejemplo, Wlodarski probó dos procesos distintos para realizar una dispersión sólida de tadalafil, mostrando que ambos procesos favorecen la liberación por encima de otras formas farmacéuticas (Wlodarski, Tajber y Sawicki, 2016). En el trabajo de Sethia y colaboradores se realizaron dispersiones sólidas de carbamazepina probando dos tipos de acarreadores y dos tipos de aglutinante, esto como estrategia para fármacos clase II. Encontraron que las suspensiones de PVP K30 con o sin acarreador presentaban mayores velocidades de disolución intrínseca, a pesar de que las formulaciones son menos complejas que las propuestas con acarreados a base de lípidos (Sethia y Squillante, 2004). En este tipo de trabajos la VDI es un parámetro que proporciona información crucial para el desarrollo de una forma farmacéutica.

Propuestas para su uso en lugar del parámetro de solubilidad, dentro del sistema de clasificación biofarmacéutico

En el trabajo de Issa MG y colaboradores, se discute el uso de la evaluación de la VDI como una alternativa para determinar la solubilidad en el SCB, con el fin de que la clasificación de solubilidad de un fármaco sea determinada por el valor de la VDI. Se

afirma que debido a que este ensayo no está relacionado con el equilibrio, sino más bien con la velocidad, se espera una mayor correlación que en la prueba de solubilidad (Issa y Ferraz, 2011). Aunque se han conseguido resultados muy comparables, también se han encontrado diferencias debido a la naturaleza de cada uno de los métodos utilizados para determinar la solubilidad. Zakeri Milani P. y colaboradores realizaron la clasificación biofarmacéutica de diferentes fármacos, a través de la VDI y la permeabilidad en intestino de rata encontrando algunas diferencias al comparar las VDI debido a que las referenciadas en la literatura fueron realizadas con otro de los métodos (disco estacionario); sin embargo, al momento de asignar una clasificación, en todos los casos se obtuvo la misma categoría de solubilidad (Zakeri Milani et al., 2009). Las aplicaciones de la VDI en la IF son escasas tanto en el área de desarrollo como de control de calidad. En este sentido, estos estudios pueden aportar evidencia de la necesidad de incluir la VDI como prueba en las monografías individuales de los fármacos para una evaluación más precisa.

En un ensayo realizado por Souza y colaboradores se comparó el uso de los métodos de solubilidad en equilibrio y disolución intrínseca en la determinación de la solubilidad con fines de la categorización de los fármacos en el SCB. En este estudio se determinó la solubilidad de losartán por ambos métodos y encontraron diferencias para definir si el losartán es de alta solubilidad entre lo reportado por Yu e investigadores en 2004 ( $0.1 \text{ mg/min/cm}^2$ ) y por Zakeri Milani en 2009 ( $1.0 \text{ mg/min/cm}^2$ ) en la prueba de disolución intrínseca. Lo anterior provocó clasificaciones contradictorias según el SCB. Los autores aseguran que, al ser la solubilidad una característica intrínseca de cada compuesto, el método para determinar su solubilidad debería ser evaluado individualmente de acuerdo a su comportamiento ante las soluciones amortiguadoras evaluadas. También ponen de manifiesto que el método de solubilidad en equilibrio no puede ser usado como método único, principalmente bajo el contexto de procurar bioexenciones (Souza et al., 2018).

Nuevas propuestas del método con modificaciones de acuerdo a necesidades especiales

Algunos trabajos han sugerido modificaciones de la técnica de disolución intrínseca de acuerdo a necesidades especiales, como la disolución en volúmenes pequeños para revelar cambios polimórficos. Estos trabajos proponen la utilización de minidisos

o minitabletas donde la cantidad de fármaco y la de medio de disolución es mucho menor a la de los aparatos ya mencionados, observando buenas correlaciones entre ambas versiones (Alsenz, Haenel, Anedda, Du Castel y Cirelli, 2016). Como es de esperarse, esta propuesta se ha comparado con la técnica tradicional para determinar su factibilidad (Avdeef y Tsinman, 2008). Tsinman y colaboradores determinaron la aproximación de  $V_{DI}$ , basados en el aparato de Wood tradicional y miniaturizado y demostraron que la cantidad de  $P_A$  usada en los aparatos tradicionales de discos rotativos podría reducirse potencialmente 10 000 veces sin sacrificar la calidad de la medición (Tsinman, Avdeef, Tsinman y Voloboy, 2009). Dado que la  $I_F$  siempre busca técnicas que optimicen sus procesos y disminuyan gastos, estos trabajos resultan pertinentes para implementarlos y evitar operaciones costosas o reducir los residuos al medio ambiente.

#### Comparación entre los métodos de aparato de Wood y la CFC

En los estudios de Peltonen y colaboradores, se comparan los métodos de disolución intrínseca y la disolución aparente por la CFC, encontrando una excelente correlación entre los métodos de disco rotatorio y la CFC; sin embargo, se mostraron algunas discrepancias con el aparato II de la USP, debido al diseño del experimento. También encontró que la manera en la que se coloca la muestra en la CFC representa un obstáculo para la desintegración, ya que solo una cara está expuesta en comparación con el aparato II de la USP (Peltonen, Liljeroth, Heikkilä, Kontturi y Hirvonen, 2003).

Este último método no está definido en las farmacopeas internacionales como un método para la disolución intrínseca, pero este estudio proporciona información valiosa sobre la comparación de los métodos de disco rotatorio y CFC. La CFC puede usarse tanto para la evaluación de polvos de sustancias puras o de mezclas, si se utiliza la configuración de la celda de polvos, ver figura 5.

Figura 5. Propuesta de configuración de celda de polvos para aparato USP IV



Elaboración propia.

### Comparaciones entre los métodos de disco estacionario y disco rotario

Al existir opciones para llevar a cabo la prueba de disolución intrínseca, no resulta fuera de lugar comparar los resultados que arroja cada tipo de aparato. En estas comparaciones se ha visto que las diferencias no son significativas estadísticamente, por lo que ambos aparatos son eficaces para realizar el estudio, sin embargo, sí se ha observado que la desviación estándar (DE) de los resultados puede ser menor en el aparato rotatorio donde se encontraron valores de DE entre 0.5-2.0% mientras que para el aparato estacionario llegan a ser de 0.2-4.0%. (Tacey, Viegas Lise, Van Winkle y Gerald Brinker, 2001)

### Efecto de las variables intrínsecas de la muestra en la VDI

Como se ha mencionado las características del estado sólido pueden afectar la VDI de un PA en estudio en tanto determinan propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, punto de fusión, forma y tamaño, entre otros. Las variaciones en los materiales de prueba repercuten en los resultados de la VDI; en un estudio realizado por Tenho y

colaboradores se determinó el impacto de la texturización del material comprimido para prueba, encontrando que el grado de texturización se correlaciona con la VDI de las muestras, de modo que las muestras con mayor grado de orientación preferencial se disolvieron más lentamente (Tenho, Aaltonen, Heinänen, Peltonen, y Lehto, 2007).

Por otro lado, Modi determinó el efecto del hábito cristalino en la VDI, evidenciando una influencia de la forma de partícula de tipo placa en la VDI de celecoxib, así como diferencia en la energía superficial debido a la diferencia en el hábito cristalino. En este caso encontraron que la reducción de tamaño de partícula no tuvo efectos significativos sobre la VDI (Modi, Dantuluri, Perumalla, Sun y Bansal, 2014). Pereira y colaboradores establecieron la regla que indica que de manera general los solvatos de nevirapina son menos solubles que sus versiones anhidras (Pereira et al., 2007).

Lobmann y colaboradores comprobaron el efecto de la presión de compactación sobre indometacina amorfa, contra su forma cristalina; esto relacionado con las diferencias superficiales derivadas de la compactación, teniendo mayor VDI la indometacina amorfa (Lobmann et al., 2014).

## CONCLUSIÓN

La calidad de una forma farmacéutica sólida oral está dada en gran medida por sus componentes y principalmente dependen del principio activo utilizado. Dado que las características de la formulación, incluyendo la vida de anaquel, desempeño del proceso, e incluso biodisponibilidad, son afectadas por las propiedades fisicoquímicas de sus componentes, se vuelve imperativo el desarrollo de metodologías que nos permitan correlacionar cada característica fisicoquímica con el comportamiento *in vivo-in vitro*, como puede ser correlacionar la estructura cristalina con la VDI (Pereira et al., 2007).

Se ha despertado interés en la aplicación de la VDI en la caracterización de principios farmacéuticos (Zakeri Milani et al., 2009), ya que esta técnica aporta datos que se correlacionan con las características físicas de los mismos (Chan y Grant, 1989). A pesar de esto, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) aún no tiene una monografía que describa este método. La VDI tampoco es una prueba de rutina en el control de calidad de las materias primas en la IF de genéricos, en la que México ocupa el primer lugar en fabricación en América Latina. El conocimiento

de las ventajas de la VDI para la caracterización de un PA podría detonar la inclusión de esta prueba durante la etapa de desarrollo de un producto y como prueba de control de calidad de los principios activos farmacéuticos; en este sentido, es necesario profundizar en el conocimiento de las propiedades del estado sólido para generar productos con controles más estrictos para garantizar la aptitud de uso y seguridad al consumidor final.

La implementación rutinaria de la VDI toma sentido en la IF con la necesidad de demostrar día a día perfiles de liberación interlote consistentes, y la importancia de esta valoración incrementa si en la etapa de fabricación del principio activo se presentan cambios en la ruta de síntesis de un activo farmacéutico, en la etapa de cristalización, en el tamaño de partícula (y por lo tanto en la superficie de área), en los cambios de proveedores, en las condiciones de proceso o bien en la transferencia. Dado que la VDI de un activo farmacéutico aporta información sobre su pureza y equivalencia (Tacey, Viegas Lise, Van Winkle, y Gerald Brinker, 2001), esta prueba puede utilizarse para evaluar la consistencia biofarmacéutica lote a lote de un fármaco.

A pesar de que la VDI se encuentra reportada en farmacopeas internacionales como la farmacopea británica, europea y americana, no se ha visto referenciada en las monografías de un PA para ser considerada en el análisis rutinario dentro de la industria, probablemente debido a la falta de información sobre su utilidad. Es de resaltarse cómo el uso de esta prueba no se encuentra referenciado para estudios de desarrollo en la FEUM, pero tampoco en los textos como los de la India o China, siendo estas últimas naciones dos grandes productores de fármacos cuyos productos se importan al mercado mexicano.

Concluyendo el trabajo de revisión se ha encontrado que existen diferencias entre las monografías de las distintas farmacopeas internacionales consultadas, entre las que destacan más las de forma que las de fondo. Hay falta de uniformidad en la profundidad de los detalles para montar el método o en la selección del medio de disolución. La USP es el texto que puede ser de mayor apoyo para la IF en México por incluir una monografía más amigable para realizar la prueba de VDI. También se encontró que la VDI se utiliza en la caracterización del estado sólido, pero ésta no es referenciada en el control de calidad de las materias primas, a pesar de que su uso puede ser de utilidad para comprender mejor los resultados analíticos relativos a la disolución de los medicamentos. En este texto fueron revisadas farmacopeas de los mercados con mayor prevalencia en la IF mexicana. Siendo China e India proveedores

importantes de fármacos para la IF nacional, resulta interesante observar que ni en las farmacopeas de estos países, ni en la FEUM se tiene incluida una monografía de disolución intrínseca. Por ello, sería importante tenerla y además poder llevarla a cabo de manera rutinaria para asegurar la consistencia de los resultados y la calidad de un principio activo farmacéutico con argumentos científicos de mayor peso.

Por otro lado, la disolución aparente definida en la farmacopea europea y británica, que hace referencia al uso de la CFC podría ser una nueva herramienta para la caracterización del estado sólido farmacéutico, así como un equivalente de la disolución intrínseca por aparato de Wood. Los estudios que emplean esta técnica se han centrado en el análisis de fármacos con baja solubilidad (Bhattachar, Wesley, Fioritto, Martin y Babu, 2002), sin embargo, existe la necesidad de realizar estudios que permitan entender el aporte de esta técnica dentro de la caracterización de un PA, así como en ensayos de rutina en el diseño y fabricación de productos farmacéuticos.

Los estudios a nivel de investigación científica revelan que la VDI es útil en la caracterización de los principios activos, y que la IF todavía no la ha explotado para el desarrollo y control de calidad de los MSO.

## REFERENCIAS

- Adeyeye, M. C. y Brittain, H. G., 2008. *Preformulation in Solid Dosage Form Development*. (M. C. Adeyeye y H. G. Brittain, Eds). New York: Informa healthcare.
- Agilent, 2010. Intrinsic Dissolution Apparatus Operator's Manual, (November).
- Alsenz, J.; Haenel, E.; Anedda, A.; Du Castel, P. y Cirelli, G., 2016. Miniaturized INtrinsic DISSolution Screening (MINDISS) assay for preformulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 87, 3-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.008>
- Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. (Elsevier, Ed.). Madrid, España: Elsevier Science Ltd.
- Avdeef, A. y Tsinman, O., 2008. Miniaturized rotating disk intrinsic dissolution rate measurement: Effects of buffer capacity in comparisons to traditional wood's apparatus. *Pharmaceutical Research* [en línea], 25 (11), 2613-2627. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9679-z>
- Banker, G. S. y Rhodes, C. T., 2002. *Modern Pharmaceutics*. (T. y F. Group, Ed.) (Fourth). Boca Raton, FL. Taylor y Francis Group.

- Bartolomei, M.; Bertocchi, P.; Antoniella, E. y Rodomonte, A., 2006. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: Comparison with anhydrous form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 40 (5), 1105-1113. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.09.009>
- Barzegar-Jalali, M.; Rahimpour, E. y Martinez, F., 2017. Determination and mathematical modelling of budesonide solubility in N-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures from T = 293 . 2 to 313 . 2 K. *Physics and Chemistry of Liquids* [en línea], 56 (6), 834-842. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00319104.2017.1408109>
- Bayona, A. y Fajardo, 2012. Importancia del desarrollo de medicamentos innovadores. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [en línea], 29 (4), 521-28. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v29n4/a16v29n4.pdf>
- Bhattachar, S. N.; Wesley, J. A.; Fioritto, A.; Martin, P. J. y Babu, S. R., 2002. Dissolution testing of a poorly soluble compound using the flow-through cell dissolution apparatus. *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 236 (1-2), 135-143. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00027-3)
- Brown, C. K.; Chokshi, H. P.; Nickerson, B.; Reed, R. A.; Rohrs, B. R. y Shah, P. A., 2005. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Dissolution Technologies* [en línea], 12 (4), 6-12. Disponible en: <https://doi.org/10.14227/DT120405P6>
- Brown, W., 2005. Apparatus 4 Flow Through Cell: Some Thoughts on Operational Characteristics. *Dissolution Technologies* [en línea], 12 (2), 28-30. Disponible en: [http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200505Articles/DT200505\\_A05.pdf](http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200505Articles/DT200505_A05.pdf)
- Bukovec, P.; Meden, A.; Smrkolj, M. y Vrečer, F., 2015. Influence of crystal habit on the dissolution of simvastatin single crystals. *Acta Chimica Slovenica* [en línea], 62 (4), 958-966. Disponible en: <https://doi.org/10.17344/acsi.2015.1849>
- Cardot, J. M. y Davit, B. M., 2012. In vitro-In Vivo Correlations: Tricks and Traps. *The AAPS Journal* [en línea], 14 (3), 491-499. Disponible en: <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9359-0>
- Carrión Recio, D.; González Delgado, C. A.; Olivera Ruano, L. y Correa Fernández, A., 1999. Bioequivalencia. Introducción a la correlación in vivo-in vitro. Parte I. *Revista Cubana de Farmacia*, 33 (2), 137-142.
- Chan, H. K. y Grant, D. J. W., 1989. Influence of compaction on the intrinsic dissolution rate of modified acetaminophen and adipic acid crystals. *International Journal of*

- Pharmaceutics* [en línea], 57 (2), 117-124. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90299-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90299-8)
- Charoenchaitrakool, M. y Dehghani, F., 2000. Micronization by rapid expansion of supercritical solutions to enhance the dissolution rates of poorly water-soluble pharmaceuticals. *Ind. Eng. Chem. Res.* [en línea], 39, 4794-4802. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/ie000151a>
- EDQM European Directorate for the Quality of Medicines, 2008. *European Pharmacopoeia, Intrinsic Dissolution*. (EDQM European Directorate for the Quality of Medicines).
- FEUM, 2014a. Métodos Generales I 196-273. In S. de Salud (Ed.), *FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (196-273). Mexico, D.F.: Secretaría de Salud.
- FEUM, 2014b. Métodos Generales II 274-375. In S. de Salud (Ed.), *FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (274-375). Madrid, España: Secretaría de Salud.
- FIP, 1997. *Join Reporte Of Guidelines For Dissolution Testing Of Solid Oral Products*.
- Fotaki, N., 2011. Flow-through cell apparatus (USP Apparatus 4): Operation and features. *Dissolution Technologies* [en línea], 18 (4), 46-49. Disponible en: <https://doi.org/10.14227/DT180411P46>
- Friedel, H. D.; Brown, C. K.; Barker, A. R.; Buhse, L. F.; Keitel, S.; Kraemer, J.; ... Shah, V. P., 2018. FIP Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.08.007>
- Gerlinde F. Ploger, Martin A. Hofs y Dressman, J. B., 2018. Solubility Determination of Active Pharmaceutical Ingredients Which Have Been Recently Added to the List of Essential Medicines in the Context of the Biopharmaceutics Classification System e Biowaiver. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 107 (6), 1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.025>
- Gibaldi, M. y Feldman, S., 1967. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 56 (10), 1238-1242. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jps.2600561005>
- Glomme, A. y Dressman, J. B., 2005. Comparison of a Miniaturized Shake-Flask Solubility Method with Automated Potentiometric Acid/Base Titrations and Calculated Solubilities. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 94 (1), 1-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jps.20212>

- González Casado, B., 2015. *Exención de estudios de bioequivalencia para nuevos medicamentos genéricos*.
- Greco, K.; Bergman, T. L. y Bogner, R., 2011. Design and characterization of a laminar flow-through dissolution apparatus: Comparison of hydrodynamic conditions to those of common dissolution techniques. *Pharmaceutical Development and Technology* [en línea], 16 (1), 75-87. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/10837450903499341>
- Hou, H. H.; Jia, W.; Liu, L.; Cheeti, S.; Li, J. y Nauka, E., 2018. Effect of Microenvironmental pH Modulation on the Dissolution Rate and Oral Absorption of the Salt of a Weak Acid-Case Study of GDC-0810. *Pharmaceutical Research*, 35 (2), 1-11.
- Issa, M. G. y Ferraz, H. G., 2011. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies* [en línea], 18 (3), 6-13. Disponible en: <https://doi.org/10.14227/DT180311P6>
- Jacob, S. y Nair, A. B., 2018. An updated overview with simple and practical approach for developing in vitro-in vivo correlation. *Drug Development Research* [en línea], 79 (3), 97-110. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ddr.21427>
- Jouyban, A., Abbasi, M. y Rahimpour, E., 2017. Deferiprone solubility in some non-aqueous mono-solvents at different temperatures: experimental data and thermodynamic modeling. *Physics and Chemistry of Liquids* [en línea], 56 (5), 619-626. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00319104.2017.1368079>
- Kakhi, M. 2009. Classification of the flow regimes in the flow-through cell. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 37 (5), 531-544. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.04.003>
- Kaur, N. Narang, A. y Bansal, A. K., 2018. Use of Biorelevant Dissolution and PBPK Modeling to Predict Oral Drug Absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [en línea], 129, 222-246. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.024>
- Kuminek, G.; Rauber, G. S.; Riekens, M. K.; Campos, C. E. M. de; Monti, G. A.; Bortoluzzi, A. J.; ... Cardoso, S. G., 2013. Single crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 78-79, 105-111. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.001>
- Lieberman, H. A.; Lachman, L. y Schwartz, J. B., 2007. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (2). New York: Informa healthcare.

- Lobmann, K.; Flouda, K.; Qiu, D.; Tsolakou, T.; Wang, W. y Rades, T., 2014. The influence of pressure on the intrinsic dissolution rate of amorphous indomethacin. *Pharmaceutics* [en línea], 6 (3), 481-493. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6030481>
- Long, M. y Chen, Y., 2009. Chapter 14. Dissolution Testing of Solid Products. *Developing Solid Oral Dosage Forms* [en línea], 319-340. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00014-X>
- Lytkin, A. I.; Chernikov, V. V.; Krutova, O. N.; Bychkova, S. A.; Volkov, A. V. y Skvortsov, I. A., 2018. Enthalpies of Dissolution of Crystalline Naproxen Sodium in Water and Potassium Hydroxide Aqueous Solutions at 298 K. *Russian Journal of Physical Chemistry A* [en línea], 92 (3), 411-414. Disponible en: <https://doi.org/10.1134/S0036024418030160>
- Mcdonnell, D.; Crane, D. M. D. A. L. J. y Redmond, B., 2017. A mathematical analysis of drug dissolution in the USP flow through apparatus, 7-9.
- Modi, S. R.; Dantuluri, A. K. R.; Perumalla, S. R.; Sun, C. C. y Bansal, A. K., 2014. Effect of crystal habit on intrinsic dissolution behavior of celecoxib due to differential wettability. *Crystal Growth and Design* [en línea], 14 (10), 5283-5292. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/cg501084a>
- NHS, 2017. Recommendations on dissolution testing. In European Directorate for the Quality of Medicines, *British Pharmacopoeia* (1-19).
- Nicoud, L.; Licordari, F. y Myerson, A. S., 2018. Estimation of the solubility of metastable polymorphs. A critical review. *Crystal Growth y Design* [en línea], 18 (11), 7228-7237. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b01200>
- Peltonen, L.; Liljeroth, P.; Heikkilä, T.; Kontturi, K. y Hirvonen, J., 2003. Dissolution testing of acetylsalicylic acid by a channel flow method-Correlation to USP basket and intrinsic dissolution methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 19 (5), 395-401. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00140-4)
- Pereira, B. G.; Fonte Boa, F. D.; Resende, J. A. L. C.; Pinheiro, C. B.; Fernandes, N. G.; Yoshida, M. I. y Vianna Soares, C. D., 2007. Pseudopolymorphs and intrinsic dissolution of nevirapine. *Crystal Growth and Design* [en línea], 7 (10), 2016-2023. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/cg0704495>
- Pharmacopoeia, E. y The, P., 2008. Of Delivered Doses From, i (1), 20927.
- Phillips, D. J.; Pygall, S. R.; Cooper, V. B. y Mann, J. C., 2012. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [en línea], 64, 1549-1559. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01523.x>

- Raghavan, S. L.; Ristic, R. I.; Sheen, D. B. y Sherwood, J. N., 2002. Dissolution kinetics of single crystals of alpha-lactose monohydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 91 (10), 2166-74. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jps.10208>
- Ramos, M. del S. L. y Baltazar, E. H., 2009. *FF* (UNAM, Ed.), Mexico, D.F.: UNAM.
- Rao, V. M.; Sanghvi, R. y Zhu, H., 2009. Chapter 1-Solubility of Pharmaceutical Solids. *Developing Solid Oral Dosage Forms* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00001-1>
- Sandri, G.; Bonferoni, M. C.; Rossi, S.; Caramella, C. M. y Ferrari, F., 2018. Effects of Particle Size, Surface Nature and Crystal Type on Dissolution Rate. *Particles and Nanoparticles in Pharmaceutical Products, AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series* [en línea], 29 (303-328). Springer International Publishing. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-94174-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-94174-5_8)
- Secretaría de Salud. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos, 2005. México: COFEPRIS [en línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html>
- Šehić, S.; Betz, G.; Hadžidedić, Š.; El-Arini, S. K. y Leuenberger, H., 2010. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 386 (1-2), 77-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.051>
- Sethia, S. y Squillante, E., 2004. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 272 (1-2), 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.025>
- Shekunov, B. y Montgomery, E. R., 2016. Theoretical Analysis of Drug Dissolution: I. Solubility and Intrinsic Dissolution Rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 105 (9), 2685-2697. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.006>
- Skinner, M. y Kanfer, I., 1992. Intrinsic dissolution rate and solubility studies on josamycin, a macrolide antibiotic. *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 88 (1-3), 151-158. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90311-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90311-O)
- Souza, J. B; De Souza, J; De Maria, L. y Castro, L. De., 2018. Evaluation of the losartan solubility in the biowaiver context by shake-flask method and intrinsic dissolution. *Pharmaceutical Development and Technology* [en línea], 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1472610>

- Tacey X.; Viegas Lise L.; Van Winkle y Gerald Brinker; Roxanne U. Curatella, 2001. Measurement of Intrinsic Drug Dissolution Rates Using Two Types of Apparatus. *Pharmaceutical Technology*, (June), 44-53.
- Tenho, M.; Aaltonen, J.; Heinänen, P.; Peltonen, L. y Lehto, V. P., 2007. Effect of texture on the intrinsic dissolution behaviour of acetylsalicylic acid and tolbutamide compacts. *Journal of Applied Crystallography* [en línea], 40 (5), 857-864. Disponible en: <https://doi.org/10.1107/S0021889807034553>
- Tseng, Y. C.; Patel, M. y Zhao, Y., 2014. Determination of intrinsic dissolution rate using miniaturized rotating and stationary disk systems. *Dissolution Technologies* [en línea], 21 (2), 24-29. Disponible en: <https://doi.org/10.14227/DT210214P24>
- Tsinman, K.; Avdeef, A.; Tsinman, O. y Voloboy, D., 2009. Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs. *Pharmaceutical Research* [en línea], 26 (9), 2093-2100. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9921-3>
- Uddin, R.; Saffoon, N. y Sutradhar, K. B., 2011. Dissolution and Dissolution Apparatus: A Review. *International Journal of Current Biomedical and Pharmaceutical Research*, 1 (4), 201-207.
- United States Pharmacopeial Convention (35). <724> Drug Release, 2012.
- United States Pharmacopeial Convention (39). <1087> Apparent Intrinsic Dissolution, 2016.
- United States Pharmacopeial Convention (39). <711> Dissolution, 2016.
- Viegas, T. X.; Curatella, R. U.; Vanwinkle, L. L. y Brinker, G., 2001. Intrinsic Drug Dissolution Testing Using the Stationary Disk System, (August), 1-4.
- Vippagunta, S. R.; Brittain, H. G. y Grant, D. J. W., 2001. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews* [en línea], 48 (1), 3-26. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00097-7)
- Wlodarski, K.; Tajber, L. y Sawicki, W., 2016. Physicochemical properties of direct compression tablets with spray dried and ball milled solid dispersions of tadalafil in PVP-VA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [en línea], 109, 14-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.09.011>
- Zakeri-Milani, P.; Barzegar-Jalali, M.; Azimi, M. y Valizadeh, H., 2009. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [en línea], 73 (1), 102-106. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.04.015>

Zhang, G. G. Z. y Zhou, D., 2009. Chapter 2. Crystalline and Amorphous Solids. Developing Solid Oral Dosage Forms. *Elsevier Inc.* [en línea], Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00002-3>



# EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL AGLUTINANTE Y LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN DE UN GRANULADOR DE ALTO CORTE EN LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE UN GRANULADO DE VALPROATO DE MAGNESIO

*Diego Gorostieta Hernández<sup>1</sup>*

*Mariana Ortiz Reynoso<sup>1\*</sup>*

*Martha Díaz Flores<sup>1</sup>*

*Liliana Schifter Aceves<sup>2</sup>*

En el presente estudio se realiza la granulación por vía húmeda de una formulación para tabletas que consistente en una mezcla de excipientes y el fármaco valproato de magnesio a escala de laboratorio, utilizando un equipo granulador de alto corte. Se combinan seis distintos agentes aglutinantes y tres velocidades de agitación diferentes. Se evalúan las características de los granulados obtenidos a través de las pruebas de distribución del tamaño de partícula, índice de flujo y perfil de compactabilidad de los granulados, y el tiempo de desintegración de tabletas obtenidas con ellos. Los resultados se analizan a través de un diseño experimental multifactorial multinivel.

## INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta a personas de todas las edades. En todo el mundo, unos 50 millones de personas padecen epilepsia, lo que la convierte en uno de los trastornos neurológicos más comunes. Cerca del 80% de los pacientes viven en países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2018); de éstos, cerca de 5 millones viven en Latinoamérica y el Caribe. La prevalencia varía de un país a otro e incluso en distintas áreas de un mismo país y en la mayor parte de los casos el tratamiento es con fármacos antiepilépticos. Cuando se presentan crisis convulsivas

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México

\* mortizr@uaemex.mx

<sup>2</sup> Universidad Autónoma Metropolitana

los fármacos tradicionales en el sector público de salud incluyen fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, ácido valproico y sus sales de sodio y magnesio, que son precursores de la forma ácida (Acevedo Manuel y Roberto, 2008).

Los efectos farmacológicos del valproato de magnesio son el resultado de que el ácido valproico y el magnesio actúan de manera complementaria. El ácido valproico incrementa la concentración cerebral de ácido  $\gamma$ -aminobutírico y el magnesio reduce la conductividad del ion calcio y activa la bomba de sodio/potasio (Canger y Guidolin, 2000).

El valproato de magnesio es farmacológicamente equivalente a la sal de sodio y al ácido valproico mismo. Después de la absorción en el torrente sanguíneo se descompone en ácido valproico y iones de magnesio, lo que tiene algunas ventajas terapéuticas. Es un fármaco altamente estable y efectivo debido a su actividad antiepiléptica añadida, proporcionada por los iones de magnesio, y a una velocidad de absorción más lenta y regular, lo que evita variaciones en los niveles séricos de ácido valproico; además de estas características, el valproato de magnesio es menos costoso que la sal de sodio (Correa, Rodríguez, 2008).

Sin embargo, en el desempeño práctico para la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, el valproato de magnesio presenta la desventaja de tener malas propiedades reológicas, lo que lo hace poco apto para la fabricación de tabletas por el método de compresión directa. Al respecto, se han realizado estudios previos en los cuales se han evaluado las propiedades de flujo, tamaño y forma de las partículas, tanto del fármaco como de mezclas de compresión directa (Ortiz Reynoso, 2016). El presente estudio es una contribución más en la investigación de la mejora de las propiedades reológicas de la formulación de valproato de magnesio, con la finalidad de tener mejores procesos y por consecuencia mejores medicamentos.

La mayoría de los ingredientes farmacéuticos activos e inactivos se presentan en estado sólido como polvos amorfos o como cristales de diversas estructuras morfológicas. El uso de sustancias multiparticulares (polvos y granulados) en la preparación de medicamentos sólidos orales (MSO), como tabletas y cápsulas, es muy frecuente en la mayoría de la industria farmacéutica. Para preparar MSO los fármacos en polvo se mezclan con excipientes y se someten a distintas operaciones unitarias.

Además de las ampliamente conocidas tabletas y cápsulas, los MSO pueden ser polvos o granulados. Estos últimos son aglomerados preparados de materiales en polvo que pueden utilizarse como forma farmacéutica. Si bien no son tan populares

los granulados como forma farmacéutica, por lo general, son un producto intermedio para la fabricación de tabletas o cápsulas (Ansel, Popovich y Allen, 1989) y de ahí que su uso en la industria farmacéutica es intensivo y que su estudio siga siendo pertinente y relevante.

La granulación húmeda de polvos es la ampliación del tamaño de las partículas a través de un proceso mediante el cual éstas se aglomeran, se compactan o se unen en estructuras más grandes y relativamente permanentes, pero en las que aún se pueden distinguir las partículas originales. La tecnología de granulación y los procesos de ampliación de tamaño han sido utilizados por una amplia gama de industrias. El proceso de fabricación de granulados consiste en una serie de operaciones sobre los ingredientes sólidos que componen la fórmula, entre los que se incluyen al menos un ingrediente activo y un aglutinante, y frecuentemente otros excipientes como diluentes, adyuvantes de flujo, surfactantes, agentes humectantes, lubricantes, edulcorantes o colorantes son empleados en la fórmula.

Los granulados farmacéuticos tienen habitualmente un intervalo de tamaño de 0.2 a 4 mm, dependiendo de su uso final y vía de administración. Los granulados que se usan para comprimir tabletas o llenar cápsulas suelen tener un tamaño entre 0.2 y 0.5 mm (Mehta, Rekhi y Parikh, 2005; Ramos y Baltazar, 2009).

Existen varias razones por las cuales es necesario efectuar una granulación, de las más importantes son prevenir la segregación de los componentes de la mezcla de polvos, uniformar el contenido del principio activo (PA) en la mezcla (especialmente en dosis bajas), mejorar el flujo, incrementar la compresibilidad de la mezcla, aumentar la densidad de un polvo o modificar la liberación.

La operación de granulación comienza después de una mezcla inicial en seco de los componentes en polvo, para conseguir una distribución uniforme de cada ingrediente en la mezcla. Existen dos grandes vías para la fabricación de granulados: la seca y la húmeda. La primera se basa en adicionar un agente aglutinante a la mezcla y someterla después a una fuerza de compactación, que generalmente es llevada a cabo en un equipo de compactación por rodillos. Al término de esta operación, se debe uniformar el tamaño de las partículas, para lo cual se emplea algún método de molturación (molienda o tamizado).

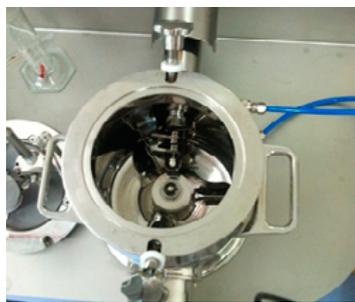
La segunda, llamada granulación por vía húmeda, es uno de los métodos más utilizados en la industria farmacéutica como etapa previa a la fabricación de comprimidos y el llenado de cápsulas, y es en esta operación unitaria en la que

centramos este trabajo. La operación se basa en la humectación de la mezcla de polvos, en la cual puede incluirse el agente aglutinante, pero con más frecuencia éste se disuelve o se dispersa en el líquido utilizado que puede ser agua o una mezcla de ésta con algún disolvente orgánico; en seguida se humecta la mezcla de polvos por aspersión del líquido aglutinante en un mezclador con agitación. La adición del aglutinante provoca la unión de las partículas en gránulos. Si el equipo no es de alto corte, los gránulos húmedos pueden hacerse pasar con presión a través de un tamiz con una determinada apertura de malla. Este proceso de granulación requiere de un paso adicional que es el secado del producto, en el cual debe controlarse la humedad residual del granulado. Finalmente, el granulado obtenido se seca y puede volver a tamizarse para homogeneizar el tamaño de las partículas.

La etapa final suele consistir en la adición de los lubricantes (y en ocasiones se mezcla con otros excipientes extra-granulares) para facilitar el flujo del polvo durante el proceso de compactación del comprimido o el llenado de la cápsula (Aulton, 2004).

El granulador de alto corte (GAC) (figuras 1a y 1b) es un equipo relativamente nuevo que es rápido y eficaz para realizar la mezcla y granulación de polvos farmacéuticos. El recipiente contiene tres paletas adosadas que se mueven sobre un eje central en el plano horizontal y una cuchilla, sistema de cuchillas o *chopper* que giran en el plano vertical. Los componentes del granulado se mezclan primeramente por el giro de las paletas; luego se añade el líquido de granulación que se mezcla con el polvo gracias al movimiento de las paletas. Una vez que la masa está bien humectada, se activa el sistema de cuchillas, cuyo objeto es romper la pasta para producir el granulado.

Figuras 1a y 1b. Granulador de alto corte (high shear)



Elaboración propia.

El proceso de GAC requiere un aglutinante más fluido en comparación con una granulación efectuada en equipos de baja cizalla o de lecho fluido, resultando en un tiempo de secado más largo pero también en un material más cohesivo.

Los excipientes aglutinantes son agentes utilizados para impartir cualidades cohesivas a los materiales en polvo; particularmente otorgan a las fórmulas de comprimidos una cohesividad que asegura que éstos permanezcan intactos después de la compresión. También mejoran las cualidades de libre flujo para los granulados, confiriéndoles la dureza, el tamaño y la forma deseados. Los materiales más comúnmente utilizados como aglutinantes son los polímeros naturales y sintéticos. Los primeros incluyen al almidón de maíz, gelatina y azúcares (como la sacarosa, la glucosa, la dextrosa y la lactosa). Los segundos, incluyen a la polivinilpirrolidona (PVP), la metilcelulosa (MC), la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y la hidroxopropilcelulosa (HPC) y las gomas naturales incluyen, goma arábica, alginato de sodio, musgo de Irlanda, goma panward, goma ghatti y veegum. Otros agentes que pueden considerarse aglutinantes en ciertas circunstancias son el polietilenglicol (PEG), la etilcelulosa (EC), las ceras, el agua y el alcohol.

La cantidad de aglutinante utilizado tiene considerable influencia sobre las características de los comprimidos compactados. Una cantidad muy grande de aglutinante puede producir un comprimido duro que no puede desintegrarse fácilmente y es capaz de causar un desgaste excesivo de los punzones y las matrices (Koo, 2017).

### Caracterización de los granulados

Existen diversas herramientas para la caracterización de los granulados; un método para determinar el flujo del material en función de los efectos cohesivos y de la fricción de las partículas es mediante el uso de una celda de corte. La configuración de celda más popular es la propuesta por Jenike; en ésta se carga un polvo y luego se comprime girando la tapa de la celda. El número de giros necesarios para cargar el polvo hasta el punto en el que la resistencia al corte (medida como la tensión aplicada al anillo alrededor del lecho) es constante. Esta fase de la prueba se conoce como “consolidación por corte”. Se reduce la carga y se registra la resistencia al corte. Se obtiene un “locus de rendimiento” de este esfuerzo cortante frente a la carga reducida

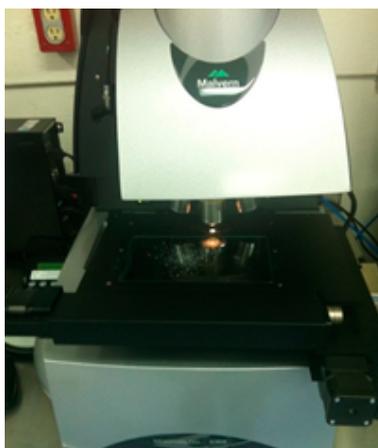
y se utiliza para calcular varios parámetros relacionados con el flujo, como el índice de flujo, la densidad aparente y el ángulo de reposo (Mehta et al., 2005).

Una ventaja significativa de la metodología de la celda de corte es un mayor grado de control experimental y repetitividad, frente a las pruebas farmacopeicas de índice de compresibilidad y velocidad de flujo. Las numerosas configuraciones existentes de celdas de corte y de métodos de ensayo proporcionan una gran cantidad de datos que pueden ser utilizados de manera eficaz para caracterizar el flujo de polvo. También son útiles en el diseño de equipos tales como tolvas y silos (Lozano, Córdoba y Córdoba, 2012).

Otras pruebas que cada vez tienen mayor impacto en la caracterización de granulados, aunque no se incluyen en las monografías farmacopeicas de las materias primas para la fabricación de medicamentos, son la distribución de tamaño de partícula (DTP) y la morfología. Para ambas pruebas es recomendable utilizar técnicas modernas, como el análisis computarizado de imagen, que incluye un software en el que se pueden obtener detalles sobre la DTP (graficándola por número y por volumen), y la morfología. En la DTP por diámetro se considera la distribución basada en el diámetro de un círculo con la misma área que la imagen proyectada por la partícula. En el rubro de morfología, pueden estudiarse características relacionadas a la forma, como es la circularidad (o medida del grado de similaridad con un círculo, siendo 1 el valor correspondiente a la forma completamente circular). En otras palabras, la circularidad es una buena medida de lo que podría describirse como desviación de un círculo perfecto. Adicionalmente, el análisis computarizado de imagen puede distinguir entre circularidad 10, circularidad 50, circularidad 90 y circularidad promedio, las cuales corresponden a la circularidad medida en cada percentil poblacional; por ejemplo, la circularidad 90 es el valor de circularidad por debajo del cual se encuentra el 90% de la muestra de partículas analizada.

La convexidad es una medida de la rugosidad de la superficie de una partícula. Una forma suave tiene una convexidad de 1, mientras que un objeto muy puntiagudo o irregular tiene una convexidad más cercana a 0 (Malvern, 2015). La figura 2 muestra un equipo Morphologi G3 de Malvern-Panalytical utilizado para estos fines.

Figura 2. Equipo Morphologi G3



Elaboración propia

Otro de los parámetros reológicos que son de interés para caracterizar polvos y granulados farmacéuticos es la compactación, que consiste en procesos simultáneos de compresión y consolidación de un sistema de dos fases (partículas sólidas-gas) debido a la aplicación de una fuerza. Las propiedades de compactación de los polvos farmacéuticos se caracterizan a través de su compresibilidad y su compactabilidad. La compresibilidad es la capacidad de los polvos para deformarse o disminuir su volumen cuando se someten a una presión. La compactabilidad se define como la capacidad de un material para formar aglomerados coherentes o compactos mecánicamente fuertes después de su compresión. Sin embargo, para fines prácticos, se entiende como la capacidad de un polvo para ser transformado en un comprimido de una resistencia específica. La compactabilidad se expresa como la pendiente de una curva de resistencia a la tensión o de resistencia a la ruptura contra la presión de compactación (perfil de compactabilidad) (Samayoa Sandoval y Villafuerte Robles, 2013).

## METODOLOGÍA

El presente estudio evalúa la influencia sobre los productos intermedio y final (granulados y tabletas) al utilizar seis diferentes agentes aglutinantes y tres velocidades de agitación, en el equipo GAC. Para la realización de las pruebas se planteó un diseño experimental (DE) factorial completo multifactorial multinivel, cuyos resultados se evaluaron estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) en un paquete Statgraphics Centurion XIV. El DE da como resultado un total de 18 combinaciones (pruebas), en las condiciones siguientes:

- A. Velocidades de agitación de las aspas, que son el mecanismo principal de mezclado, y del cortador o *chopper*, cuya función es eliminar los aglomerados formados. Las configuraciones del equipo fueron las siguientes (tres niveles: alta, media, baja).
  - a. Alta = 1000 rpm aspas/2500 chopper
  - b. Media = 750 rpm aspas/2000 chopper
  - c. Baja = 500 rpm aspas/1500 chopper

Se eligieron dos tipos de aglutinantes más comunes en la industria farmacéutica: la polivinilpirrolidona (PVP) en sus grados K30 y K90, con menor y mayor poder aglutinante, respectivamente. También, se eligieron una hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de tipo químico 2910 y una Hidroxipropilcelulosa (HPC) de bajas viscosidades (15 cps y 4.5 cps, respectivamente); los derivados de celulosa son comúnmente utilizados para granular y son una alternativa confiable de las PVP. Además, se eligió un coprocesado de almidón de maíz, que es una variante del almidón nativo que tiene poco más de una década en el mercado y cuya ventaja es ser diluyente, aglutinante, desintegrante y autolubricante en un solo producto; es decir, es multifuncional. Por último, se consideró en el estudio el maltitol, un poliol utilizado como aglutinante, diluyente y edulcorante en la formulación de tabletas oro-dispersables y masticables, para explorar este tipo de materiales utilizados en esos MSO.

1. PVP K30 (Kollidon, Basf).
2. PVP K90 (Kollidon, Basf).
3. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) 60-HD-15 (SheffCel, Kerry).
4. Almidón de maíz parcialmente pregelatinizado (Starch 1500, Colorcon).

5. Hidroxipropilcelulosa (HPC) SL-FP (Nisso).
6. Maltitol (SweetPearl, Roquette).

Todos los líquidos aglutinantes se diseñaron a una concentración del 10% en solución acuosa, y en una proporción del 2% en la mezcla para comprimir. La tabla 1 muestra las corridas experimentales con estos materiales y las condiciones experimentales empleadas.

**Tabla 1. Combinación de niveles del diseño de experimento**

<i># Experimento</i>	<i>Aglutinante</i>	<i>Velocidad</i>	<i>Codificación</i>
1	HPMC 60-HD-15	Baja	HPMC-B
2	PVP K90	Media	K90-M
3	PVP K30	Media	K30-M
4	HPMC 60-HD-15	Media	HPMC-M
5	HPMC 60-HD-15	Alta	HPMC-A
6	PVP K90	Baja	K90-B
7	HPC SL-FP	Alta	HPC-A
8	Starch 1500	Baja	ST-B
9	HPC SL-FP	Baja	HPC-B
10	Starch 1500	Alta	ST-A
11	Maltitol	Alta	MT-A
12	PVP K30	Alta	K30-A
13	Maltitol	Media	MT-M
14	Maltitol	Baja	MT-B
15	HPC SL-FP	Media	HPC-M
16	PVP K90	Alta	K90-A
17	PVP K30	Baja	K30-B
18	Starch 1500	Media	ST-M

Elaboración propia

### Hipótesis del diseño experimental

H1= en la granulación de las formulaciones de valproato de magnesio se encontrarán diferencias en las características fisicoquímicas en la fabricación de las combinaciones de aglutinante y velocidad de agitación, que mejoren las características reológicas.

Ho= en la granulación de las formulaciones de valproato de magnesio no se encontrarán diferencias en las combinaciones de aglutinante y velocidad que mejoren las características reológicas.

La fórmula modelo empleada se eligió tomando como base una dosis por tableta del valproato de magnesio de 200 mg y un peso final de 350 mg. Se escogieron como diluentes dos materiales de primera elección para las granulaciones por vía húmeda: la lactosa monohidratada y la celulosa microcristalina. Asimismo, se adicionaron un desintegrante (dado que la tableta es de liberación inmediata) y un lubricante a la fórmula para cuidar el estado de los punzones y matrices. La tabla 2 muestra las cantidades de materias primas empleadas en cada lote del estudio.

Tabla 2. Fórmula modelo

<i>Fórmula por tableta:</i>	<i>mg por tableta</i>	<i>%</i>	<i>g para 1 lote de 250 g</i>
Valproato de magnesio (Signa)	200	57.14	142.80
Lactosa monohidratada (Granulac 200/Meggle)	69	19.71	49.30
Celulosa microcristalina (Avicel PH 101, FMC)	60.5	17.28	43.20
Aglutinante (6 diferentes, según Diseño de Experimentos)	7	2.00	5.00
Croscarmelosa de sodio (Vivasol GF/JRS Pharma)	10	2.85	7.20
Estearato de Mg*	3.5	1.00	2.50
Agua	cbp	--	70 ml
Total	350 mg	100	250

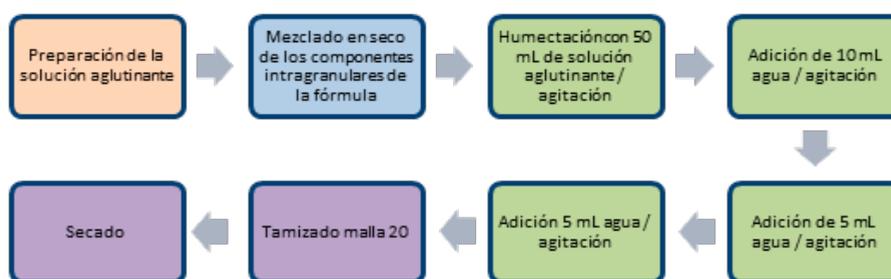
\* Se adiciona de manera extragranular.  
Elaboración propia.

### Fabricación del granulado

Se fabricaron 18 lotes de 250 g cada uno, según el diseño experimental, granulándolos en el GAC con un mezclador de capacidad de 2 l. Previo al proceso de humectación-granulación, se realizó una mezcla en seco de los componentes a 100 rpm por 2 minutos. Las soluciones aglutinantes fueron dosificadas durante el proceso utilizando la pistola de aspersión acoplada al GAC a una presión de 2 bar y alimentada por una bomba peristáltica Longer modelo Precise BT100-2J a una velocidad de flujo de 10 ml/min. La solución aglutinante fue preparada con agua destilada en

un volumen de 50 ml. Otros 20 ml de agua se adicionaron en tres partes durante el proceso de granulación, según se muestra en el diagrama 1. Se realizó la granulación a la velocidad indicada para cada condición. Al final del proceso de granulación el producto se hizo pasar por una malla USA no. 20. El granulado obtenido se secó en dos charolas de 40 cm x 30 cm a 60 °C durante 90 minutos, registrando la curva de secado, indicada más adelante.

Figura 3. Diagrama general del proceso de granulación



Elaboración propia.

La determinación de humedad se realizó de acuerdo al método MGA 0671 para pérdida por secado de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). La pérdida por secado es la cantidad de materia volátil, en este caso agua, que contiene una muestra de polvo (Secretaría de Salud, 2014). Se utilizaron muestras de granulado de 5 g en una termobalanza Ohaus MB45 en corridas de 60 °C x 10 minutos tomadas a los 30, 60 y 90 minutos, intentando obtener un valor cercano al calculado para la mezcla seca, según las humedades reportadas para los componentes individuales.

Se realizó la determinación de densidad aparente y flujo utilizando el equipo Powder Flow Tester de Brookfield, el cual tiene como principio el uso de una celda de corte, que mide las fuerzas de corte y de consolidación, con la finalidad de proporcionar información del flujo y densidad del polvo en cuestión. Esta prueba se llevó a cabo con los granulados obtenidos, así como con el principio activo y la mezcla de principio activo y excipientes sin granular.

Se evaluaron la distribución de tamaño de partícula (DTP) y la morfología de los granulados por el método de análisis computarizado de imagen en un equipo

Morphologi G3 de Malvern, con el objeto de comparar las distribuciones y formas entre lotes de cada uno de los granulados. El análisis se realizó tomando una muestra de 60 mg para cada determinación, la cual se dispersó bajo una presión de 4 bar sobre la platina del equipo. Se realizó el escaneo sobre una superficie de 30 mm de diámetro (706 mm<sup>2</sup>) y con un objetivo de 10X (3.5 µm-210 µm) en un tiempo aproximado por corrida de 99 minutos. Los criterios de clasificación se fijaron en 9 categorías: 1-5 micras, 5-10 micras, 10-20 micras, 20-30 micras, 30-40 micras, 40-50 micras, 50-100 micras, 100-200 micras, mayor a 200 micras. Se evaluaron los parámetros de conteo de partículas, diámetro promedio, circularidad promedio y circularidad 90.

Una vez obtenidos los granulados, se realizó la compresión de los mismos en una prensa hidráulica Carver con un punzón redondo de 10 mm de diámetro a una presión de 1000 lb-f para obtener las tabletas, y se determinó el perfil de compactabilidad de los granulados mediante un durómetro Erweka semiautomático. Es decir, se elaboraron tres tabletas con cada lote de granulado fabricado utilizando cinco fuerzas de compactación diferentes con la finalidad de elaborar el respectivo perfil de compactación de manera gráfica, de dureza vs. fuerza de compresión.

Se llevaron a cabo las determinaciones de la prueba farmacopeica de MGA 0261, que se basa en el tiempo requerido por una forma farmacéutica sólida para desintegrarse en un fluido de prueba en un tiempo determinado y bajo condiciones de operación preestablecidas. Este ensayo aplica a cápsulas y tabletas con o sin recubrimiento, así como a granulados efervescentes y tabletas efervescentes. La desintegración no implica la solubilización total de la tableta; la desintegración completa se define como la condición en la que quedan sobre la malla del aparato fragmentos insolubles de la tableta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de la humedad del granulado

Los resultados de la prueba de humedad inicial (antes de la humectación) y la cinética de secado tras la humectación muestran que, en el tiempo igual a 30 minutos, existen diferencias en el valor de humedad de hasta 6 puntos en la escala de porcentaje, pero

al tiempo final del secado (90 minutos) las diferencias son menores. La tabla 3 da los resultados individuales para la prueba de humedad de los granulados. La figura 4 muestra la curva de secado o comportamiento de la humedad con respecto al tiempo, para todos los granulados.

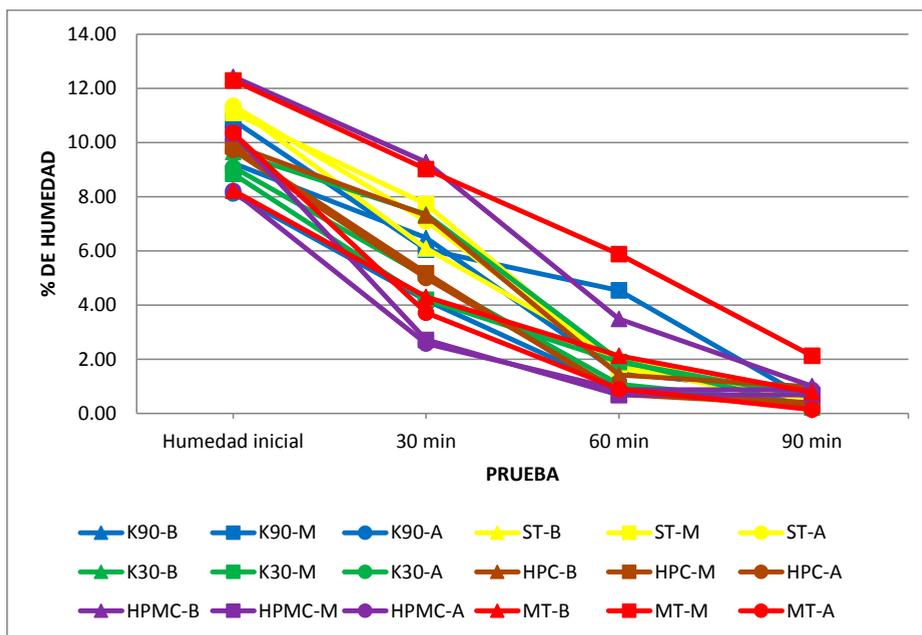
Tabla 3. Resultados de la prueba de humedad

Codificación	Humedad inicial	Humedad después de la granulación	Tiempo (minutos)		
			30	60	90
HPMC-B	0.93 %	12.43 %	9.28 %	3.49 %	1.01 %
K90-M	0.70 %	10.83 %	6.05 %	4.54 %	0.45 %
K30-M	0.79 %	8.85 %	4.20 %	1.90 %	0.62 %
HPMC-M	0.98 %	10.34 %	2.72 %	0.68 %	NR
HPMC-A	0.88 %	8.22 %	2.58 %	0.87 %	NR
K90-B	0.86 %	9.24 %	6.48 %	1.50 %	0.75 %
HPC-A	1.69 %	9.73 %	5.00 %	0.84 %	0.39 %
ST-B	0.82 %	11.37 %	6.09 %	2.05 %	0.39 %
HPC-B	0.84 %	9.91 %	7.31 %	1.42 %	0.98 %
ST-A	0.81 %	11.36 %	7.10 %	1.75 %	0.29 %
MT-A	1.69 %	10.36 %	3.72 %	0.90 %	0.14 %
K30-A	0.87 %	9.09 %	5.06 %	1.07 %	0.36 %
MT-M	0.89 %	12.30 %	9.02 %	5.88 %	2.13 % *
MT-B	1.45 %	8.23 %	4.30 %	2.13 %	0.78 %
HPC-M	0.89 %	9.86 %	5.18 %	0.70 %	0.32 %
K90-A	0.78 %	8.12 %	4.18 %	0.93 %	0.28 %
K30-B	0.75 %	9.65 %	7.35 %	1.96 %	0.22 %
ST-M	1.58 %	11.10 %	7.73 %	1.67 %	0.50 %

NR: prueba no realizada debido a que en el minuto 60 se detuvo el secado, por haber llegado la humedad al valor teórico de la mezcla seca (antes de la humectación). \*Para esta prueba el valor de la humedad inicial (humedad blanco) se alcanzó hasta los 120 minutos con 0.74 %

Elaboración propia.

Figura 4. Cinética de humedad

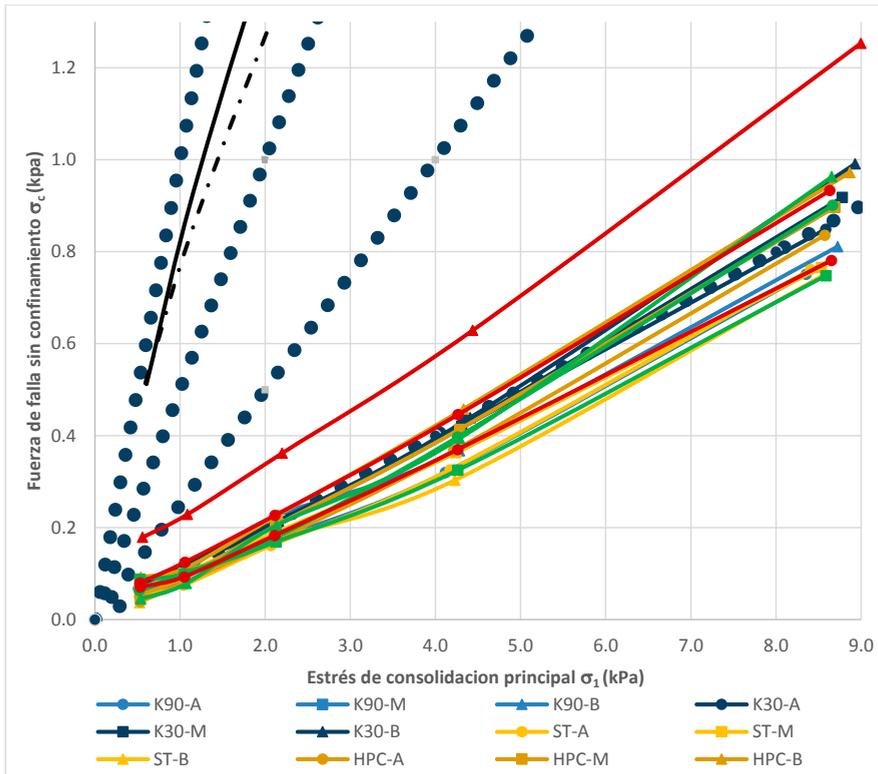


Elaboración propia.

### Evaluación de la función de flujo

El índice de flujo medido en el equipo PFT representa la pendiente de la recta entre la fuerza de falla sin confinamiento versus el estrés de consolidación principal. La figura 5 muestra la función de flujo de los 18 lotes fabricados, en la cual puede verse que todos los granulados están ubicados en la porción baja del área del gráfico, zona que el software del equipo clasifica como de libre flujo y fácil flujo, lo que nos indica que no son materiales cohesivos y que todos, con excepción del maltitol granulado en condición de velocidad baja, tienen un flujo considerado de libre flujo o un valor cercano a él. En la prueba de flujo para el principio activo sólo y para la mezcla seca de éste con los excipientes (es decir, sin granular), se observó que las curvas resultantes se encuentran en la zona de polvo muy cohesivo en la gráfica de función de flujo de polvos.

Figura 5. Función de flujo de los lotes

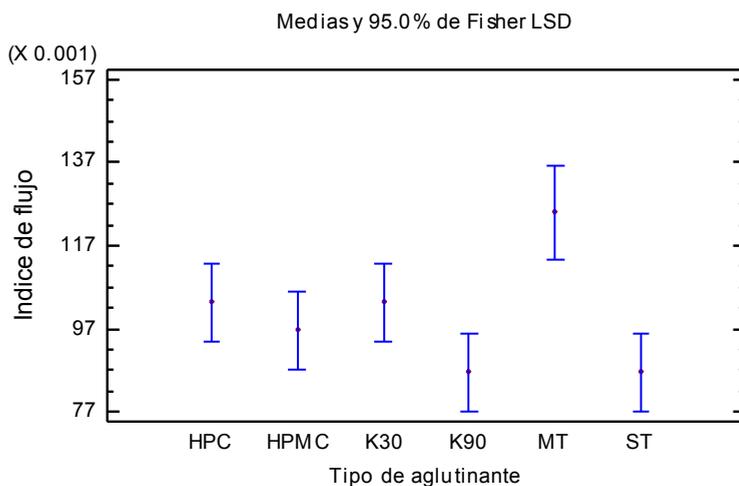


Elaboración propia.

Las curvas punteadas delimitan las áreas en las que se clasifica el material como muy cohesivo, cohesivo, fácil flujo y de libre flujo (Brookfield, s/a).

Estos hallazgos concuerdan con los resultados del ANOVA efectuado para el factor tipo de aglutinante, en el que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.0184$ ) para el maltitol en la prueba de índice de flujo. Al comparar los valores medios obtenidos para los seis tipos de aglutinante, se determinó que sí hay diferencias significativas entre las medias del maltitol con respecto a todos los demás aglutinantes, como se observa en la figura 6.

Figura 6. Comparación de medias del índice de flujo por tipo de aglutinante

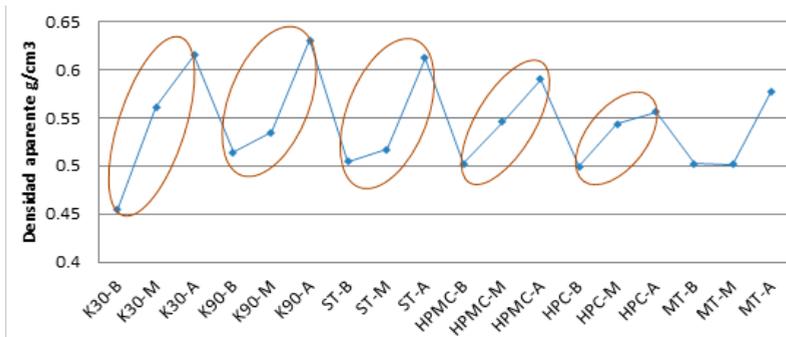


HPC: hidroxipropilcelulosa; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa; K30: polivinilpirrolidona K30; K90: polivinilpirrolidona K90; MT: maltitol; ST: almidón de maíz parcialmente pregelatinizado.  
Elaboración propia.

### Evaluación de la densidad aparente de los granulados

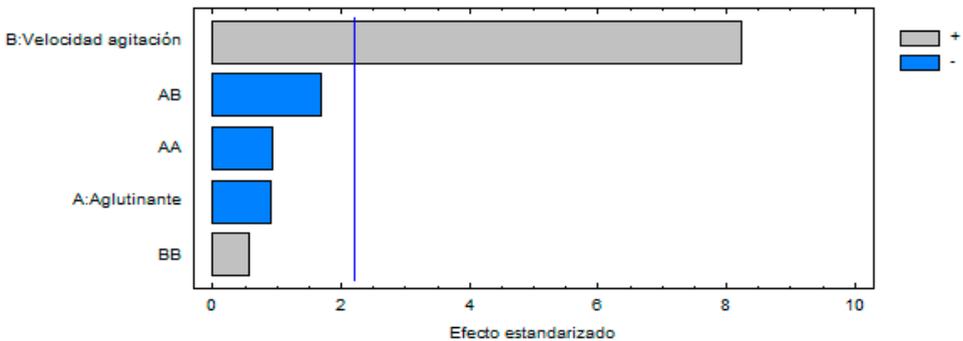
Se encontró que la velocidad de agitación es el factor que influye más en la densidad aparente. La figura 7 muestra los valores de densidad aparente para cada prueba realizada, agrupados por tipo de aglutinante y por velocidad. En ella se observa una tendencia directamente proporcional al aumento de la densidad aparente conforme se incrementa la velocidad de agitación en cada uno de los aglutinantes, excepto para el de maltitol. La figura 8 corresponde al diagrama de Pareto estandarizado para la densidad aparente de los granulados obtenido del análisis factorial. En ésta puede verse que el efecto de la velocidad de agitación es el único factor determinante en la densidad aparente de los granulados.

Figura 7. Densidad aparente de los granulados



Elaboración propia.

Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizado para la densidad aparente de los granulados



Elaboración propia.

### Evaluación de la DTP y morfología de los granulados

En la tabla 4 se muestran los resultados de circularidad promedio por lote de granulado. La información se agrupa en cada tipo de aglutinante según la velocidad de granulación, de mayor a menor. Como puede verse, la mayor cantidad de partículas se encuentra en los granulados manufacturados con el aglutinante maltitol, lo cual puede deberse a que las muestras se tomaron por masa (variando el volumen) y, dado que existe variación en las densidades de cada granulado, el conteo de partículas no es

similar. Aunque los valores de diámetro promedio de las partículas van desde los 9.63 hasta los 25.3 micrómetros, en esta variación no existe una diferencia estadísticamente significativa entre tipos de aglutinantes con un valor  $p = 0.3071$ .

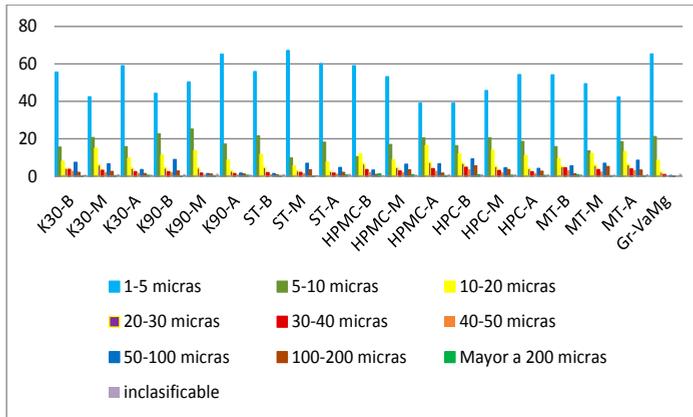
**Tabla 4. Conteo de partículas escaneadas por lote y sus propiedades promedio**

<i>Codificación</i>	<i>Número de partículas evaluadas (n)</i>	<i>Diámetro promedio (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Circularidad promedio</i>
HPMC-A	104,871	17.05	0.718
HPMC-M	47,504	17.82	0.726
HPMC-B	50,388	11.61	0.726
K90-A	49,809	9.63	0.734
K90-M	131,724	10.44	0.713
K90-B	96,155	17.62	0.721
HPC-A	71,419	14.25	0.747
HPC-M	78,768	17.26	0.737
HPC-B	45,691	25.3	0.730
ST-A	72,465	13.49	0.744
ST-M	126,483	15.04	0.683
ST-B	76,541	9.68	0.752
K30-A	80,030	12.19	0.741
K30-M	160,404	16.98	0.718
K30-B	160,304	15.11	0.688
MT-A	122,392	19.33	0.740
MT-M	76,739	20.23	0.716
MT-B	373,879	13.72	0.691

Elaboración propia.

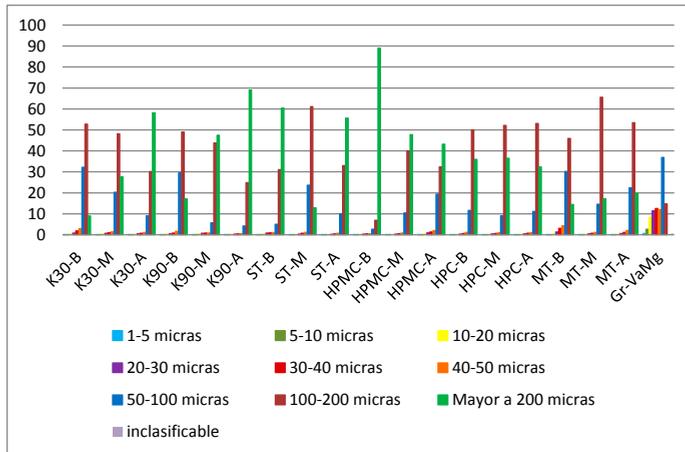
Las figuras 9a y 9b comparan las curvas de DTP, mostrando las distribuciones tanto por número (6a) como por volumen (6b). En ambos casos en el eje de las abscisas se indica el tamaño de partícula en micrómetros y en el eje de las ordenadas se muestra la frecuencia expresada en porcentaje para cada intervalo de tamaños de partícula.

Figura 9a. Distribución de tamaño de partícula por número (%)



Elaboración propia.

Figura 9b. Distribución de tamaño de partícula por volumen (%)



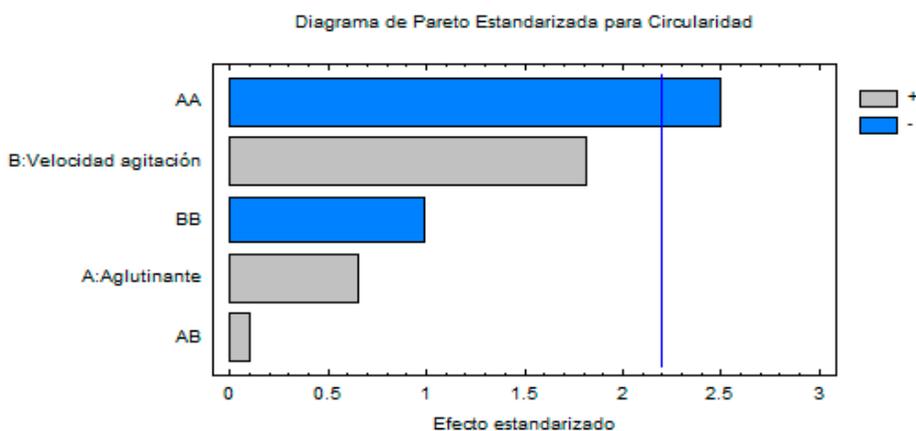
Elaboración propia.

Se observaron porcentajes de finos (partículas de 1 a 5 micrómetros) entre el 30 y el 70% para todos los lotes evaluados en la prueba de DTP por número; también en todos los lotes el porcentaje de partículas mayores a 200 micrómetros es menor del 2% (gráfica 9a). Sin embargo, en la gráfica de DTP evaluada por volumen, los finos

ocupan espacios muy pequeños (casi despreciables) y los gruesos ocupan volúmenes sustanciales, como se puede ver en la gráfica 9b.

Los valores de circularidad promedio obtenidos están cerca del 0.7 para todos los lotes. El diagrama de Pareto estandarizado para la prueba de circularidad promedio, muestra que el aglutinante es el único factor que es determinante para esta variable de respuesta.

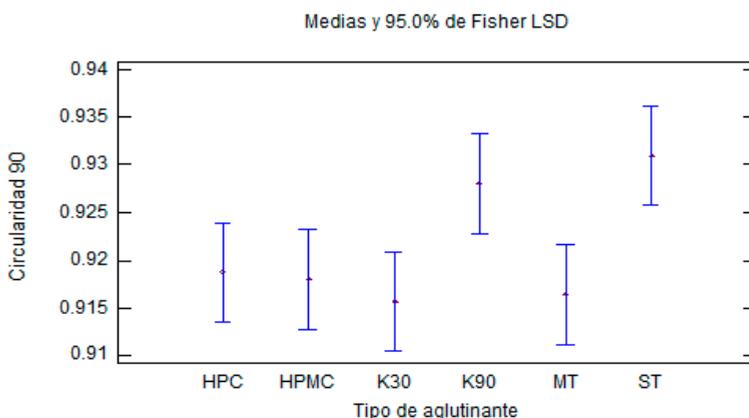
Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizado para la variable de respuesta circularidad promedio de los granulados



Elaboración propia.

Para conocer más a fondo el efecto del aglutinante, se realizó un ANOVA de un factor para cada aglutinante, ignorando la velocidad de granulado (es decir, tomando como repeticiones las tres velocidades de agitación), para las respuestas diámetro promedio, diámetro 90, circularidad promedio, circularidad 90, tiempo de desintegración y dureza. De todos estos análisis, solamente para la respuesta de circularidad del percentil 90 se observaron diferencias significativas entre las medias, como se muestra en la figura 11. Las diferencias se manifestaron para los aglutinantes PVP K90 y almidón de maíz parcialmente pregelatinizado.

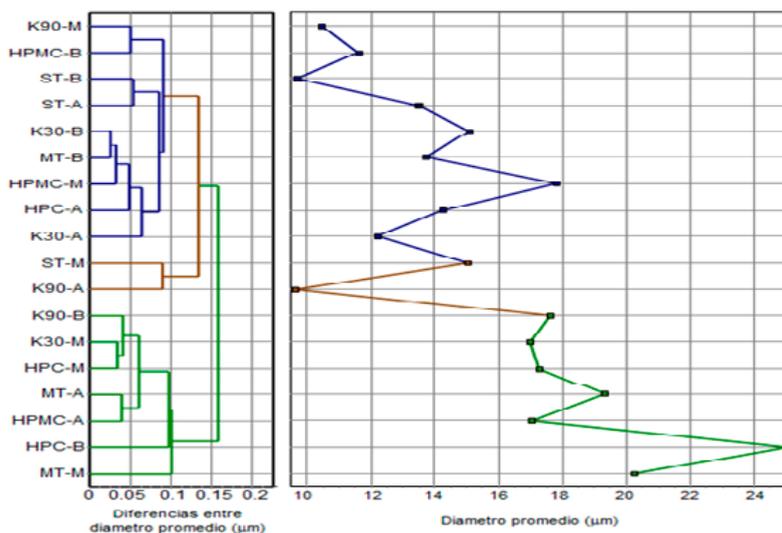
Figura 11. Comparación de medias de circularidad 90 por tipo de aglutinante



Elaboración propia.

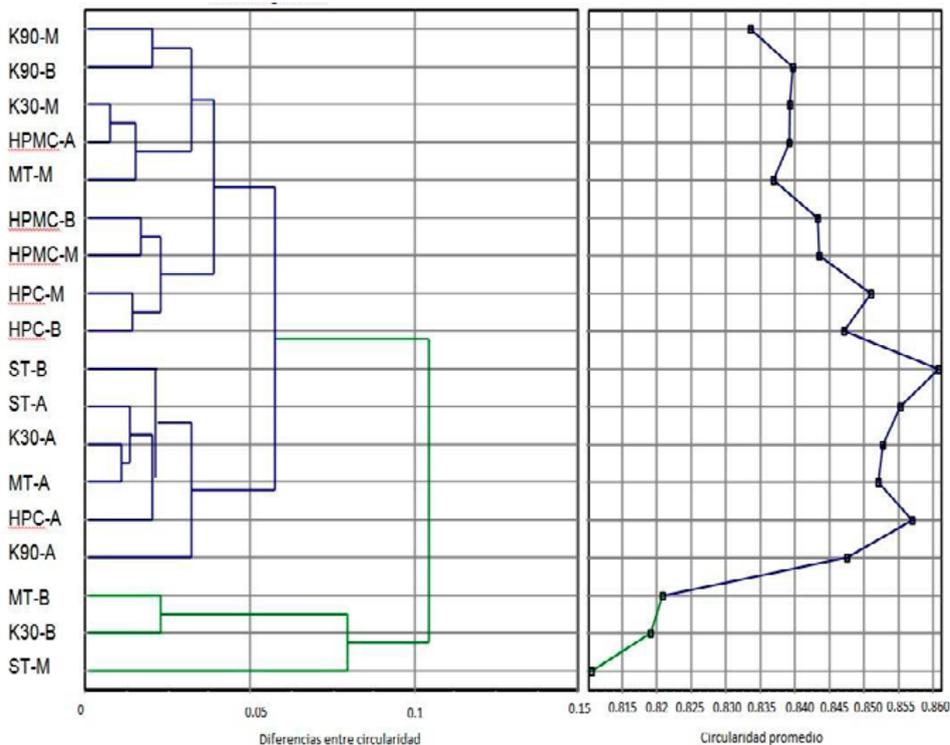
Adicionalmente para las variables de diámetro promedio y circularidad se obtuvo el gráfico de dendrograma; este diagrama de árbol muestra los grupos que se forman al crear conglomerados entre pruebas y sus niveles de similitud.

Figura 12. Dendrograma del diámetro promedio de los granulados



Elaboración propia.

Figura 13. Dendrograma de circularidad



Elaboración propia.

### *Evaluación de las tabletas*

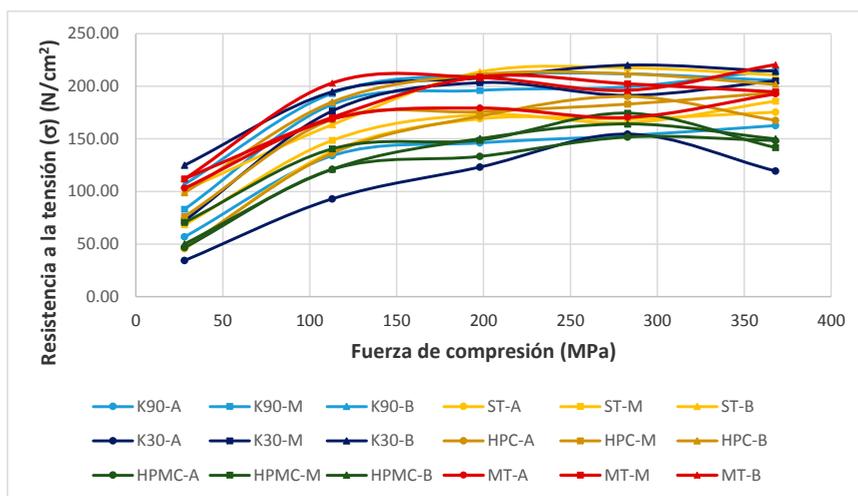
En la tabla 5 y la figura 14 se muestran, para cada lote evaluado, los resultados de la resistencia a la tensión, calculados a partir de la relación entre la dureza y el área de las tabletas obtenidos a diferentes fuerzas de compactación, con tabletas redondas, planas, de 10 mm de diámetro. La figura 15 muestra las curvas de compactabilidad linealizadas calculadas a partir del logaritmo de la fuerza tensil contra la densidad relativa de las tabletas, la cual se calculó a su vez a partir de la densidad de estas obtenida a cada presión de compactación dividida por la densidad de las materias primas (Samayoa Sandoval y Villafuerte Robles, 2013).

Tabla 5. Resultados del perfil de compactabilidad para tabletas de las 18 pruebas

Prueba	Fuerza de compresión (MPa)				
	28	113	198	283	368
K90-B	106.93	193.36	210.89	211.71	205.47
K90-M	83.28	182.82	196.08	199.43	215.60
K90-A	56.84	133.98	146.13	153.09	162.56
ST-B	101.10	163.64	213.72	217.62	210.85
ST-M	68.36	148.71	173.15	165.46	186.01
ST-A	45.45	138.04	169.08	169.08	175.44
K30-B	124.92	194.75	207.94	220.12	214.27
K30-M	72.26	176.71	203.53	191.49	205.25
K30-A	34.36	93.02	123.22	154.58	119.47
HPC-B	98.96	185.16	211.26	212.00	201.88
HPC-M	76.16	168.50	175.84	183.03	193.98
HPC-A	47.07	136.37	171.63	190.36	167.63
HPMC-B	50.27	121.26	150.24	164.27	150.02
HPMC-M	70.64	140.53	148.80	147.42	141.69
HPMC-A	46.83	121.06	133.39	151.76	148.36
MT-B	111.97	203.02	208.19	196.14	220.52
MT-M	112.06	170.40	209.01	202.35	194.64
MT-A	103.16	168.87	179.34	170.46	192.80

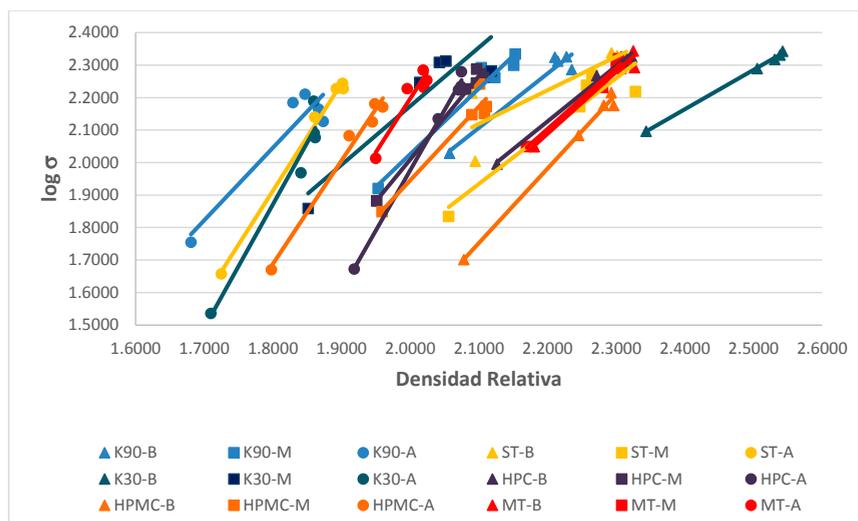
Elaboración propia.

Figura 14. Curvas de compactabilidad para tabletas de los granulados de los 18 lotes fabricados



Elaboración propia.

Figura 15. Curvas de compactabilidad linealizadas para tabletas de los granulados de los 18 lotes fabricados



Elaboración propia.

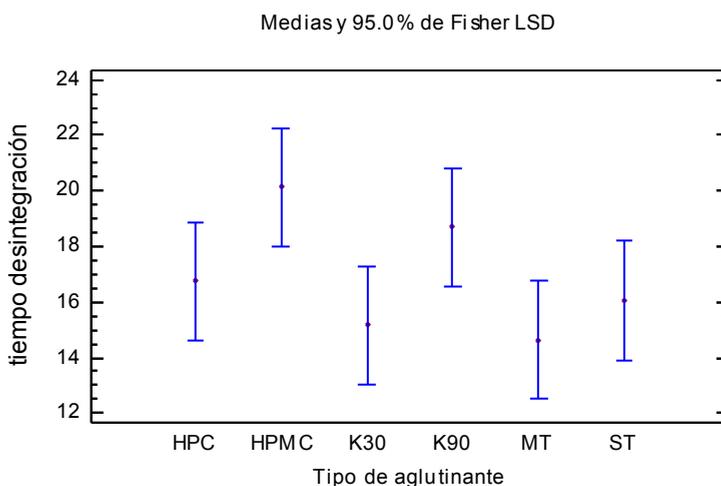
Con respecto a los resultados de la prueba de desintegración de tabletas, la tabla 6 muestra los tiempos de desintegración de los comprimidos fabricados con cada granulado y la figura 16 compara las medias por tipo de aglutinante. El ANOVA muestra que existen diferencias significativas en las medias de los tiempos para los aglutinantes HPMC y PVP K90 con respecto a los demás.

**Tabla 6. Tiempos de desintegración de tabletas**

<i>Aglutinante</i>	<i>Tiempo de desintegración (minutos)</i>
HPMC-B	21.4
HPMC-M	24.3
HPMC-A	14.7
K30-B	14.7
K30-M	15.8
K30-A	15.0
K90-B	16.2
K90-M	20.8
K90-A	19.1
HPC-B	18.0
HPC-M	15.6
HPC-A	16.7
ST-B	17.8
ST-M	15.1
ST-A	15.3
MT-B	14.1
MT-M	15.6
MT-A	14.2

Elaboración propia.

Figura 16. Comparación de medias del tiempo de desintegración por tipo de aglutinante.



Elaboración propia.

Los resultados de humedad indican que, a pesar de agregar la misma cantidad de agua a todos los lotes, la humedad inicial varía sustancialmente (del 8% a poco más del 12%), lo que podría deberse a la actividad de agua (entendida como el cociente entre la presión de vapor del material cuando se alcanza un balance con el aire circundante, y la presión de vapor del agua destilada en idénticas circunstancias) (Food and Drug Administration, 2015) de cada uno de los excipientes aglutinantes. Los valores de humedad residual muestran que en todos los casos es posible llegar a una humedad final menor al 2%, con excepción del aglutinante maltitol a velocidad media. Entre un mismo aglutinante, las dinámicas de secado que menos varían son las del Starch 1500 en todas las velocidades de agitación, seguidas de los lotes fabricados con HPC; las que más variaciones presentan, especialmente en el primer tercio del tiempo de secado, son el HPMC y el maltitol. Estas consideraciones pueden resultar útiles para calcular eficiencias de secado en términos del consumo de energía requerido para cumplir con una especificación de humedad.

Sobre la evaluación del flujo de los granulados, se observó que todos los lotes fabricados se encuentran entre las zonas de fácil flujo y libre flujo indicadas según el software del PFT, por lo que tienen un flujo aceptable desde el punto de vista del desempeño farmacotécnico y por lo tanto son aptos para comprimir tabletas o

llenar cápsulas. Esta poca variación muestra que el GAC es un equipo robusto para la respuesta de salida de flujo, en tanto, soporta cambios tanto en la formulación como en las condiciones de proceso y que en todas las condiciones se cumple el objetivo de mejorar el flujo de los sólidos multiparticulados, a través de la operación de granulación a alta velocidad. El ANOVA realizado para la variable del índice de flujo revela que el flujo del granulado fabricado con el aglutinante maltitol es distinto al obtenido por todos los demás aglutinantes. Esto es un resultado comprensible, dado que el maltitol no se elige en términos de su capacidad de flujo, sino su selección como excipiente se debe a la vía de administración del medicamento, que suele ser masticable u oro-dispersable. Sin embargo, los datos ayudan a tener en cuenta que, en la fabricación de tabletas con maltitol deberá cuidarse el flujo del polvo o granulado con mayor atención. Por otro lado, se observó que las líneas de índice de flujo para el valproato de magnesio y la mezcla en seco de éste con excipientes, se comportan de manera similar, ubicándose en la zona de polvo muy cohesivo; este resultado refuerza la efectividad de granular este principio activo.

En cuanto a la determinación de densidad aparente, se encontró que la velocidad de agitación es el factor que más influye en ella. Si bien, en el índice de flujo no se encontraron diferencias debidas a la velocidad de agitación, sí las hubo para la densidad aparente, como se observa en la gráfica 4, en la que se nota una clara tendencia en el aumento de la densidad con el aumento de velocidad; siendo el maltitol el único aglutinante para el que esto no se cumple. Ello soporta la idea de que las condiciones de proceso impactarían en operaciones unitarias clave como el llenado de cápsulas o el llenado de las matrices en la tableteadora.

El dendrograma de diámetro nos muestra que existen diferencias entre tres grupos de pruebas agrupadas por similitud, la mayor diferencia está en las pruebas realizadas con los aglutinantes almidón de maíz parcialmente pregelatinizado a velocidad media y la PVP K90 a velocidad alta. El dendrograma de circularidad nos muestra dos agrupaciones principales donde el más pequeño agrupa las pruebas hechas con maltitol a velocidad baja, la PVP K30 a velocidad baja y el almidón de maíz parcialmente pregelatinizado a velocidad media, siendo este último en coincidencia en el dendrograma de diámetro promedio.

En el análisis automatizado de la morfología de los granulados, se encontró que existe variación significativa entre el tamaño promedio de partícula, lo que sugiere que hay un impacto importante en la DTP por acción tanto del aglutinante como de

las condiciones de proceso. La tendencia en el comportamiento de los aglutinantes ante las variaciones en la velocidad de agitación es distinta para cada caso. Los materiales en los que se obtiene una relación inversamente proporcional entre el tamaño de partícula y la velocidad de agitación son el HPC y ambas PVP. En cambio, esto no se encontró para el maltitol o el almidón de maíz, lo que puede explicarse por los distintos mecanismos de formación del granulado (coalescencia, rotura y adhesión o transferencia por erosión) que son favorecidos con cada polímero (Mehta et al., 2005). Asimismo, se observaron porcentajes elevados de finos (1 a 5 micrómetros) para todos los lotes evaluados en la medición de la DTP por número. El efecto contrario se vio en la DTP por volumen. Esto se explica porque en la primera se privilegia precisamente el conteo de partículas y no el volumen que éstas ocupan, mientras que en el segundo caso lo que se resalta es el espacio que ocupa cada intervalo de tamaño elegido.

Respecto a la variable de respuesta de circularidad promedio el análisis estadístico del diseño factorial muestra que el aglutinante es el único factor que es determinante para esta variable. Asimismo, el ANOVA unifactorial para la variable de circularidad 90 da diferencias significativas entre las medias de la PVP K90 y el Starch 1500, siendo similares los efectos entre ellos y diferentes con respecto al resto de los aglutinantes. Esto indica que existen diferencias en la forma particular de los granulados, y que quizá convenga estudiar su impacto con mayor detalle en estudios ulteriores, considerando la convexidad y la disolución.

Para la prueba de desintegración de las tabletas, el ANOVA muestra que existen diferencias en las medias de los tiempos registrados para el HPMC 60 HD15 y la PVP K90 con respecto a los demás, lo cual refleja un comportamiento similar entre estos dos aglutinantes.

## CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos se comprueba la hipótesis alternativa, ya que en la granulación de las formulaciones de valproato de magnesio existen diferencias en las características de los granulados. Los parámetros que estadísticamente se ven más afectados con las combinaciones de aglutinante y velocidad son los parámetros de densidad y de circularidad. De manera general, se distingue que la densidad aparente

de los granulados aumenta conforme acrecenta la velocidad, independientemente del aglutinante. Y la mejor circularidad se favorece a velocidades de agitación altas.

El índice de flujo del granulado fabricado con maltitol es distinto al obtenido por todos los demás aglutinantes; lo cual demuestra que este aglutinante tiene un comportamiento diferente. El maltitol es usado en caso de fabricación de tabletas masticables y oro-dispersables, en las que se privilegian las propiedades organolépticas (como sabor, olor y sensación en la cavidad bucal) frente a las farmacotécnicas.

## REFERENCIAS

- Acevedo, C., C. M.; Manuel, C. y Roberto, C., 2008. Informe sobre la Epilépsia en latinoamérica. *Organización Panamericana de La Salud*.
- Ansel, H. C.; Popovich, N. G. y Allen, L. V., 1989. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. *Journal of Chemical Information and Modeling* [en línea], 9, 160. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aulton, M. E., 2004. Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. España: *Elsevier* [en línea]. Disponible en: <https://books.google.com/books?id=r5k1fvgCi71Cypgis=1>
- Brookfield, A., s/a. *Brookfield Powder Flow Tester, Operating instructions* [en línea] (Vol. 8139). En línea: <http://www.brookfieldengineering.com>
- Canger, R. y Guidolin, L., 2000. Clinical efficacy and tolerability of magnesium valproate as monotherapy in patients with generalised or partial epilepsy: A nonblinded study of 320 patients. *Clinical Drug Investigation* [en línea], 20 (4), 215-221. Disponible en: <https://doi.org/10.2165/00044011-200020040-00002>
- Food and Drug Administration, 2015. (aw) [en línea]. Disponible en: <https://www.fda.gov/iceci/inspections/inspectionguides/inspectiontechnicalguides/ucm072916.htm>
- Koo, O. M. Y., 2017. *Pharmaceutical Excipients: properties, functionality, and applications in research and industry*. Wiley.
- Lozano, M. del C.; Córdoba, D. y Córdoba, M., 2012. *Manual de Tecnología Farmacéutica*. España: Elsevier.
- Malvern, 2015. Morphologi G3 User Manual.
- Mehta, K. A.; Rekh, G. S. y Parikh, D. M., 2005. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1201/9780849354953.ch17>

- Organización Mundial de la Salud, 2018. *Epilepsia* [en línea]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Ortiz Reynoso, M., 2016. Trabajo libre, impacto de la variación del lote en la disolución intrínseca de un fármaco. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47, 145.
- Ramos, M. del S. L. y Baltazar, E. H., 2009. *Formas Farmacéuticas Sólidas*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Samayoa Sandoval, L., y Villafuerte Robles, L., 2013. Compactabilidad como un parametro de funcionalidad del excipiente GalenIQ 720. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 44 (3), 34-45.
- Secretaria de Salud, 2014. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estdos Unidos Mexicanos.
- Tania Correea, Ildefonso Rodriguez, S. R, 2008. Population Pharmacokinetics of Valproate in Mexican Children with Epilepsy. *Biopharmaceutics y Drug Disposition* [en línea] 29, 511-520. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bdd>

# ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DEL VALPROATO DE MAGNESIO EN MATRICES HIDROFÍLICAS DE HPC Y HPMC

*Wendy C. Sánchez Brito*<sup>1\*</sup>

*Mariana Ortiz Reynoso*<sup>1</sup>

En los medicamentos sólidos orales (MSO), el control de la velocidad de liberación del fármaco es posible a través del uso de matrices, dentro de las cuales las más utilizadas son las hidrofílicas, que se caracterizan por la inclusión de excipientes poliméricos en la fórmula de las tabletas.

En este estudio se compara la liberación del fármaco valproato de magnesio a partir de matrices hidrofílicas, empleando dos éteres de celulosa: hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxipropilcelulosa (HPC). El proyecto trata de generar información científico-tecnológica útil para las empresas farmacéuticas en el estudio de matrices de liberación controlada, ofreciendo una alternativa innovadora al establecer posibles ventajas tecnológicas de la HPC frente a la HPMC.

La disminución de la frecuencia de dosis (o el número de tomas diarias) es una ventaja competitiva porque simplifica el tratamiento aumentando las posibilidades de adherencia terapéutica. Esta mejora en la administración de los principios activos debido a la formulación de matrices hidrofílicas también se ve reflejada tanto en el control de los perfiles de liberación, como en su idoneidad para la fabricación. En este estudio se prepararon mezclas del principio activo valproato de magnesio y excipientes, modificando únicamente el tipo químico y viscosidad del polímero modificador de la liberación del fármaco. Las tabletas se comprimieron en una tableteadora y se determinaron como variables de salida fuerza de ruptura, friabilidad y perfil de disolución de las tabletas.

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México.

\* wendy\_ceci9@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en el desarrollo de sistemas que permiten que un fármaco pueda liberarse con una velocidad controlada o bien en una región determinada del cuerpo. Hoy en día son frecuentes los medicamentos sólidos orales (MSO) que prolongan el efecto de los fármacos, para reducir su frecuencia de dosificación y aumentar la adherencia terapéutica; modulando la liberación del principio activo desde la forma farmacéutica, permitiendo el avance tanto del conocimiento farmacocinético de medicamentos, como de las investigaciones en la obtención de polímeros biocompatibles (Arredondo, 2009; Costa, Arancibia y Añache, 2004).

Para el tratamiento de las enfermedades se requieren diferentes clases de fármacos, los cuales son administrados por distintas vías corporales en función a sus propiedades fisicoquímicas como al sitio de acción, tipo y duración del efecto deseado. La vía de administración oral presenta varias ventajas, entre ellas la comodidad de los pacientes, por lo que es considerada la primera opción. Sin embargo, la administración oral conlleva algunos inconvenientes frente a las administraciones intravenosa o intramuscular, como son el menor control de los niveles séricos necesarios del medicamento y el metabolismo de primer paso del fármaco (que puede inactivar buena parte del fármaco, haciendo necesario un aumento de dosis), lo que en ocasiones hace poco eficiente el tratamiento. Además, la administración oral puede involucrar efectos colaterales derivados del paso de los fármacos por regiones ajenas al lugar donde se produce la afección. Estos inconvenientes se ven acentuados si el MSO es de liberación inmediata, por lo que la liberación prolongada de los fármacos supone una ventaja tecnológica desde el punto de vista farmacéutico.

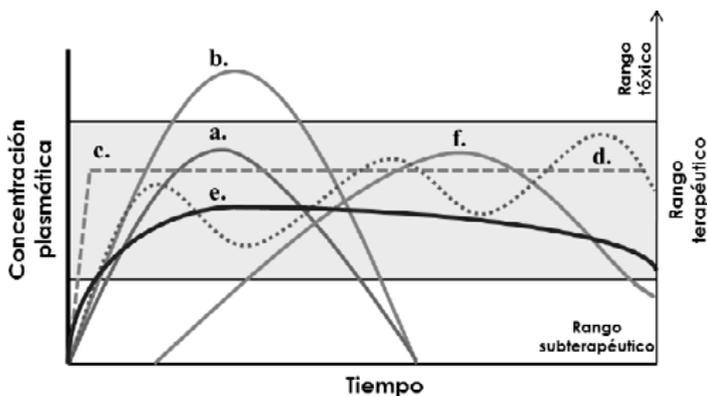
Así, la liberación controlada de las sustancias activas en los humanos se presenta como una alternativa de solución a la anterior situación y por tanto ha concentrado gran atención en las últimas dos décadas, presentándose como dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos. Si bien se observa una labor investigadora importante desde el punto de vista tecnológico, ésta no siempre se corresponde con un avance de relevancia clínica. En la actualidad existen a la venta numerosos medicamentos que emplean este tipo de sistema, muchos de los cuales emplean tecnologías sofisticadas (de altos costos) para su elaboración, difícilmente alcanzables para países en vías de desarrollo.

Por este motivo, es de considerable interés el desarrollo de formulaciones relativamente simples que también sean capaces de lograr una liberación prolongada (contienen el fármaco uniformemente distribuido liberándose de manera gradual), son muy utilizadas por la facilidad y bajos costos de fabricación. Las matrices hidrofílicas, en particular, son ampliamente utilizadas en el mercado farmacéutico y han probado su efectividad como sistema de liberación prolongada por varias décadas. Una de las principales ventajas de estos sistemas es que se puede obtener mediante tecnologías convencionales similares a las utilizadas para la producción de tabletas de liberación inmediata, por lo que no suponen una inversión en las áreas o equipamiento de manufactura.

### Sistemas de liberación modificada

Una forma farmacéutica de liberación modificada está definida como una “preparación en la que la velocidad o el sitio de liberación del principio activo es distinto respecto al de la forma farmacéutica convencional, administrada por la misma vía” (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005). Las modificaciones consisten en cambios en la formulación y en el método de fabricación. Al diseñar un sistema terapéutico de liberación modificada deben tenerse en cuenta diversos factores como el origen de la enfermedad, las propiedades del principio activo, el tipo de terapia, la vía de administración, las propiedades y características del material polimérico empleado, además del mecanismo de liberación del principio activo. La figura 1 clasifica los diferentes sistemas de liberación comparando los distintos niveles plasmáticos tras la administración de un fármaco. Según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) la liberación prolongada es una “condición en la que la formulación permite garantizar una liberación más lenta de el o los fármacos por un tiempo determinado” (Secretaría de Salud, 2014); es decir, que la liberación prolongada es un tipo de liberación modificada.

Figura 1. Representación gráfica de los niveles plasmáticos en diferentes sistemas de liberación



- a) Liberación inmediata, b) liberación inmediata doble dosis, c) Liberación a velocidad constante,
- d) Liberación repetida, e) Liberación prolongada y f) Liberación retardada.

Fuente: Silva, 2012.

Los sistemas matriciales pueden ser considerados en la actualidad como la manera más simples y menos costosa de prolongar la liberación de fármacos. Estos sistemas retardan y regulan la liberación del principio activo mediante un proceso que sigue las leyes de la difusión (Pertuso, Navarro, Cabral, 2007). En estas matrices el principio activo está uniformemente distribuido en el seno de un polímero y la liberación del fármaco depende en primera instancia del tipo, proporción, tamaño de partícula y solubilidad del polímero, de la geometría de la matriz y de la solubilidad y tamaño de partícula del fármaco, otros factores pueden modificar la liberación del principio activo como la forma, el área superficial del sistema matricial y la presión de compresión (Costa, Arancibia y Aïache, 2004).

Los fármacos solubles son liberados principalmente por difusión, mientras que los poco solubles prevalece el mecanismo de erosión de la matriz en la liberación del fármaco.

### Tipos de sistemas matriciales de liberación prolongada

Si bien las matrices hidrofílicas son las más populares, observando el comportamiento de las matrices que están en contacto con los fluidos biológicos se distinguen, de

acuerdo a su composición (que a su vez rige el mecanismo y la velocidad de liberación), tres tipos de matrices: inertes, lipídicas e hidrofílicas, que tienen mecanismos de liberación diferentes (Costa, Arancibia y Aïache, 2004; Pertuso, Navarro, Cabral, 2007), que siguen las leyes de la difusión y erosión.

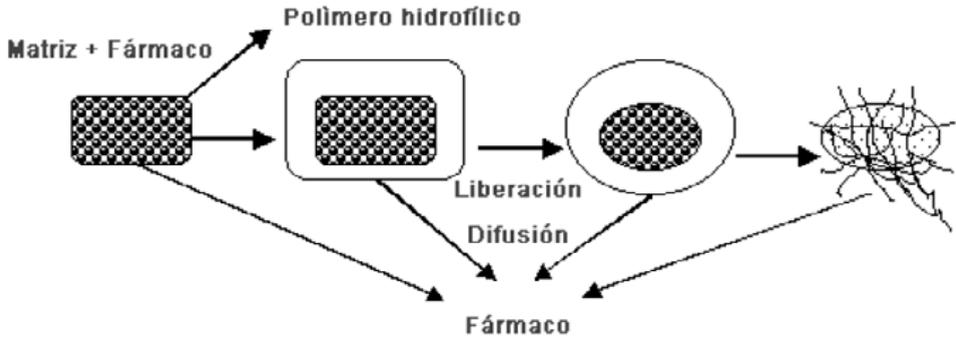
- a) Matrices inertes: denominadas comúnmente “matrices plásticas o insolubles”, forman una red sólida porosa compuesta de sustancias no tóxicas, no digeribles e insolubles en el tracto gastrointestinal las cuales se eliminan de forma intacta en heces. El proceso de liberación de fármaco ocurre por difusión a través de los poros de la matriz y depende de la concentración del fármaco, su solubilidad, los aditivos y la naturaleza de los líquidos de la granulación empleados en su elaboración. Este tipo de matriz se usa esencialmente para las moléculas solubles (Arredondo, 2009; Pertuso, Navarro y Cabral, 2007).
- b) Matrices lipídicas: son a menudo llamadas “matrices insolubles” o “matrices cerosas” a causa de su apariencia. En este tipo de matrices, el principio activo se suspende en un excipiente lipídico que está constituido principalmente por glicéridos saturados (mono, di y triglicéridos), ácidos y alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y de alcoholes de bajo peso molecular y por ceras, en el que queda aprisionado o “incrustado”. Las matrices lipídicas son muy bien toleradas por el tracto gastrointestinal, ejerciendo una acción protectora frente a fármacos que producen irritación de la mucosa gastrointestinal (Costa, Arancibia y Aïache, 2004; Silva, 2012).
- c) Matrices hidrofílicas: se obtienen mezclando el principio activo con polímeros hidrofílicos. En presencia de medios acuosos presentan una elevada capacidad gelificante siendo capaces de hincharse, aumentando considerablemente de volumen. Cuando estas formas farmacéuticas entran en contacto con un medio acuoso (medio gástrico o intestinal), se produce una hidratación instantánea de las moléculas más superficiales que forman la interfaz sólido-líquido, dando lugar a la formación de una capa viscosa. El proceso concluye con una total gelificación del sistema y con la liberación del principio activo, ya sea por difusión, por erosión o por una mezcla de ambos mecanismos (Lastres, 2002; Pertuso, Navarro y Cabral, 2007). Por ser este el tema principal de este trabajo, a continuación, se describe con mayor profundidad este tipo de matrices.

## Matrices poliméricas hidrofílicas

Las matrices poliméricas de liberación modificada de tipo hidrofílico favorecen la disminución de la frecuencia de dosificación, incrementando la duración del proceso de liberación de fármacos y consiguiendo que el intervalo terapéutico se mantenga por más tiempo. La compresión de una mezcla de un fármaco relativamente soluble con el polímero da lugar a matrices que, en contacto con el medio de disolución acuoso, se hidratan e hinchan, dando lugar a la formación de un gel a través del cual se difunde el fármaco (Silva, 2012). Como se ha dicho, el amplio uso de los sistemas matriciales hidrofílicos en la industria farmacéutica (IF) se debe principalmente a que la tecnología involucrada es altamente repetible y de bajo costo, lo que multiplica sus ventajas a nivel de desarrollo, producción, adquisición de insumos y control de calidad. Las tabletas elaboradas a base de matrices hidrofílicas son fáciles de fabricar, gracias a los avances en el estudio de los polímeros y en el conocimiento de los factores que influyen el comportamiento de éstos sistemas, por lo que, desde hace algunos años las matrices hidrofílicas son la primera elección en la formulación de MSO de liberación prolongada (Swarbrick, 2007).

La liberación controlada de sustancias activas se basa en la idea de proveer la cantidad óptima del agente activo, en el momento preciso y en el lugar adecuado (Nakamatsu, 2002). La figura 2 muestra el proceso de liberación de los fármacos desde una matriz hidrofílica. Como puede observarse, el proceso que sufre la matriz comienza con una etapa de hinchamiento debida a que su composición química suele ser a base de un polímero hidrofílico. En segunda instancia, el material forma una capa de gel que de inmediato modifica la liberación del fármaco. A medida que la matriz recorre el tracto digestivo, el líquido orgánico penetra la matriz y el área de hidratación continua aumentando hasta un punto de máximo hinchamiento, luego del cual el sistema reduce su tamaño y se erosiona. Finalmente el polímero se disuelve totalmente.

Figura 2. Proceso de liberación desde una matriz hidrofílica.



Fuente: Costa, E., Arancibia y Aïache, 2004.

Los polímeros gelificantes formadores de matrices hidrofílicas pueden ser de origen natural o semisintético, como el agar-agar y alginatos o los quitosanos y almidones modificados, entre otros. Sin embargo, los más utilizados son los derivados celulósicos sintéticos como la carboximetilcelulosa (CMC), la hidroxietilcelulosa (HETC), la hidroxipropilcelulosa (HPC), la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o la metilcelulosa (MC). También existe un tipo de polímeros derivados del ácido acrílico que forman parte de los carbómeros y que se conocen con el nombre comercial Carbopol, de gran interés para diversas aplicaciones (Lastres, 2002).

Las tabletas de liberación prolongada fabricadas a base de matrices hidrofílicas pueden obtenerse por cualquiera de las tres vías clásicas de fabricación: compresión directa, granulación seca o granulación húmeda. La compresión directa consiste en mezclar los ingredientes y alimentar la tableteadora directamente. Este es el método de primera elección por su sencillez, reproducibilidad y bajo costo. Sin embargo, la mayoría de los principios activos carecen de las características de densidad, flujo, compresibilidad y compactabilidad para ser sometidos a un proceso de compresión directa. Por ello, son comunes los métodos de granulación, que consisten en aumentar el tamaño de partícula de los polvos para mejorar sus propiedades de flujo, compresibilidad y compactabilidad.

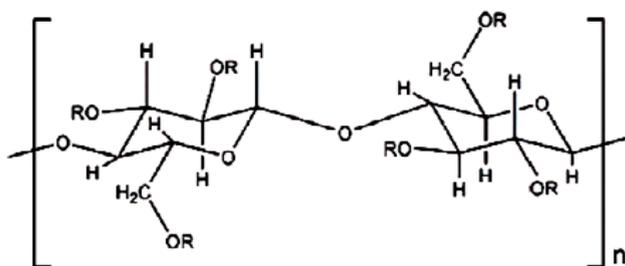
Aunque la granulación húmeda requiere mayores tiempos de proceso y eleva el número de pasos (y por tanto los puntos críticos del proceso y el riesgo derivado

de aumentar las posibilidades de error), el equipo tecnológico necesario para implementarlo es de uso común en la IF. Esto lo hace más atractivo frente a la granulación seca, que requiere de un equipo compactador de rodillos que es menos frecuente.

### *Hidroxiopropilmetilcelulosa (HPMC)*

La HPMC, también conocida como “hipromelosa”, es un éter de la celulosa que posee grupos metoxi e hidroxipropoxi en su estructura, como se presenta en la figura 3.

Figura 3. Estructura de la HPMC. R indica un grupo metilo o hidroxipropilo



Fuente: Sánchez, Damas, Domínguez y Cerezo, 2010.

La HPMC está disponible comercialmente en diferentes presentaciones; ya sea como polvo o gránulo, ambos de color blanco, blanco amarillento o blanco grisáceo. Posee un carácter higroscópico; la cantidad de agua que absorbe depende del contenido inicial de humedad, de la temperatura y de la humedad relativa del aire circundante (Sánchez et al., 2010). Algunas de sus principales propiedades fisicoquímicas aparecen en la tabla 1 que se muestra a continuación.

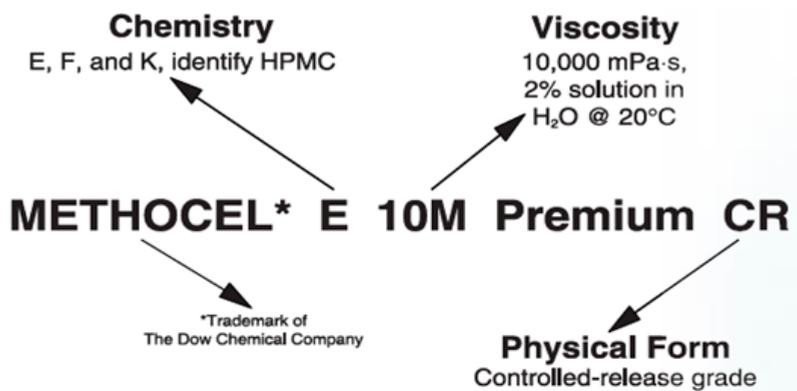
Tabla 1. Principales propiedades físico-químicas de a HPMC

<i>Propiedad fisicoquímica</i>		<i>Valor promedio</i>
pH (solución acuosa 1% m/m)		5.5-8.0
Cenizas		1.5-3.0 %
Solubilidad	Insoluble	Cloroformo, etanol, éter, agua caliente, acetona y tolueno
	Soluble	Agua fría, mezclas hidroalcohólicas y diclorometano
T. transición vítrea		170-180°C
T. caramelización		190-200°C
T. carbonización		225-230°C
T. ignición		360°C
Densidad aparente		0.341 g/cm <sup>3</sup> (llenado) y 0.557 g/cm <sup>3</sup> (tras golpeo)
Densidad real		1.326 g/cm <sup>3</sup>

Fuente: Sánchez et al, 2010.

Los tipos químicos de HPMC dependen principalmente de la relación y distribución de los grupos funcionales presentes en la molécula; esto es la proporción o contenido de los grupos metoxi (-OCH<sub>3</sub>) e hidroxipropoxi (-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>). El valor aproximado del peso molecular total está vinculado a la viscosidad de la solución acuosa del polímero medida en solución acuosa al 2% a 25 °C. Las combinaciones de viscosidad y proporción de los grupos químicos, establecen distintas propiedades y alteran el comportamiento matricial, y explican las diferencias en los grados de HPMC disponibles en el mercado (Ambasana, Kaila, Thakkar, Saravaia y Shah, 2011). El nombre comercial del HPMC de The Dow Chemical Company es Methocel. La figura 4 explica la nomenclatura de estos productos de acuerdo al tipo químico, la viscosidad elegida y forma física y la tabla 2 explica las propiedades de algunos productos METHOCEL. La denominación Premium hace referencia a la aprobación para uso farmacéutico

Figura 4. Ejemplos de nomenclatura para el producto METHOCEL



Fuente: Dow, 2000.

Tabla 2. Propiedades de los productos seleccionados METHOCEL para uso en matrices hidrofílicas farmacéuticas

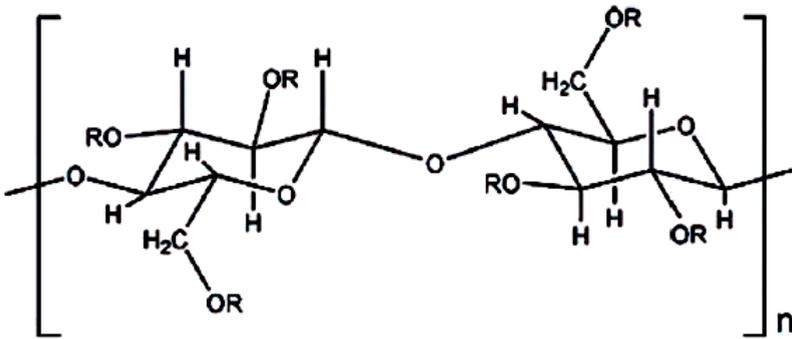
METHOCEL Premium product grade	—	K100 Premium LV	K4M Premium	K15M Premium	K100M Premium	E4M Premium	E10M Premium CR
Methoxyl, %	USP	19–24	19–24	19–24	19–24	28–30	28–30
Hydroxypropoxyl, %	USP	7–12	7–12	7–12	7–12	7–12	7–12
USP substitution type	USP/EP	2208	2208	2208	2208	2910	2910
Chlorides, max., %	EP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Apparent viscosity, 2% in water at 20°C, cP	USP	80–120	3000–5600	11250–21000	80000–120000	3000–5600	7500–14000
Apparent viscosity, 2% in water at 20°C, mPa·s	EP	78–117 [98 Nom]	2308–3755 [2903 Nom]	6138–9030 [7382 Nom]	16922–19267 [18243 Nom]	2308–3755 [2903 Nom]	4646–7070 [5673 Nom]
ID Test A, B, C	USP	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
ID Test A, B, C, D, E, F	EP	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Opalescence of solution	EP	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Solution color, yellowness, 1% in water	EP	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
pH, 1% in water	EP	5.5–8.0	5.5–8.0	5.5–8.0	5.5–8.0	5.5–8.0	5.5–8.0
Loss on drying, max., %	USP/EP	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Organic impurities, volatile	USP	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Residue in ignition, max., %	USP	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Ash, sulfated, max., %	EP	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Heavy metals, as Pb, max., ppm	USP/EP	10	10	10	10	10	10

Fuente: Dow, 2000.

## Hidroxiopropilcelulosa (HPC)

La HPC es un compuesto termoplástico soluble en agua y en solventes orgánicos. Al igual que la HPMC en la industria farmacéutica se emplea como formador de película en tabletas recubiertas, como aglutinante en granulados y en matrices hidrofílicas de liberación prolongada (Nisso HPC, 2012). La figura 5 muestra su estructura básica.

Figura 5. Estructura de la HPC. R indica un grupo hidroxilo o hidroxipropilo



Fuente: adaptación de Sánchez et al, 2010.

Algunos autores consideran que las matrices de HPMC son las más utilizadas tanto por la variedad que se puede encontrar en el mercado, como por que son las más utilizadas desde el punto de vista teórico experimental, debido a que sus propiedades de hinchamiento y solubilidad permiten interpretar con mayor certeza los fenómenos de interacción fármaco-polímero (Andreetta, 2003). Sandoval y colaboradores también han reportado que el HPMC es el polímero hidrófilo más empleado en la preparación de matrices de liberación prolongada, ya que tienen un alto grado de hinchamiento que tiene un efecto significativo en la cinética de liberación del fármaco. (Sandoval et al., 2008). Sin embargo, y a pesar de la probada funcionalidad del HPMC como polímero formador de matrices hidrofílicas. Cote reportó que en el 2010, de los diez medicamentos de liberación prolongada más vendidos a nivel mundial, siete empleaban HPC, y que en Japón la cifra subía a nueve (Cote, 2011).

## Evaluación de matrices hidrofílicas

La evaluación de las matrices hidrofílicas comprende desde la valoración de la calidad de las materias primas (descrita en las monografías farmacopeicas de materiales y en el certificado de análisis del fabricante), las pruebas de control de proceso (operaciones unitarias involucradas, que son molienda, tamizado, mezclado y compresión) y producto intermedio (debe evaluarse para asegurar que el objetivo de cada operación unitaria se ha alcanzado, la calidad tanto de granulados y mezclas intermedias determina la calidad de las tabletas) y las pruebas de producto terminado. Algunas pruebas físicas son recomendables, revelando el correcto avance del proceso y apego a las especificaciones intermedias. En particular, las pruebas de DTP, índice de compactación, velocidad de flujo y ángulo de reposo son recomendables para los polvos y granulados, mientras que las de friabilidad y fuerza de ruptura son requeridas para tabletas (Wildenow, 2013).

### *Pruebas físicas para polvos y granulados*

- a) Distribución del tamaño de partícula, DTP: esta prueba es uno de los métodos más empleados para clasificar los polvos y granulados, consiste en la separación de las partículas según su tamaño intermedio (medido como el ancho o amplitud). Este método se emplea principalmente para estimar la distribución total del tamaño de partícula de un material homogéneo, ya sea por masa o por volumen, y comúnmente se expresa en una gráfica de porcentaje de retención en función del tamaño de partícula. El método analítico consiste en el ensamble de tamices en un orden de mayor a menor apertura de malla, de arriba abajo. El polvo o granulado a evaluar previamente pesado se coloca en el tamiz superior, seguido de lo cual el juego de tamices que contiene la muestra sólida se agita durante un periodo estandarizado. A medida que esto sucede, las partículas van pasando o reteniéndose en cada malla. Al terminar esto se pesa la cantidad retenida en cada tamiz y se grafica en % retenido en función del tamaño particular (medido como el número de tamiz). Existen técnicas para determinar la DTP más rápidas, confiables y modernas, basadas en la dispersión de la luz. La figura 6 muestra un equipo de determinación del tamaño de partícula por difracción de rayos láser de Malvern Panalytical.

Figura 6. Equipo Morphologi GS03 de Malvern



Fuente: Laboratorio de Farmacia, Facultad de Química, UAEMEX.

- b) Índice de compresibilidad: es una medida que representa cómo cambian la energía básica de fluidez y el grado de compactación del polvo cuando se proporciona un aumento de energía mecánica sobre el mismo. Este índice se desprende de dos medidas: a) la densidad aparente; muestra la relación de la masa de una muestra de polvo sin asentar y su volumen y b) la densidad compactada, que se obtiene después del golpeteo mecánico (producido por el levantamiento del recipiente que lo contiene y su impacto a una altura específica durante “n” repeticiones) de un recipiente de medición graduado que contiene la muestra a analizar. Se emplea la misma muestra de polvo que en la prueba de densidad aparente, obteniéndose un valor menor que el de densidad compactada debido a la reducción de volumen lograda tras el golpeteo mecánico (Wildenow, 2013). El índice de compresibilidad y el índice de Hausner, son la comparación entre la densidad aparente y la densidad compactada, indican la propensión de un polvo a la compresión. La tabla 3 y 4 muestran el índice de compresibilidad, el índice de Hausner y las propiedades de flujo de los descritos en la FEUM y en la United States Pharmacopeia (USP).

Tabla 3. Índice de compresibilidad e índice de Hausner

Índice de compresibilidad	Propiedades de flujo	Índice de Hausner
5 a 11	Excelentes	1.00 a 1.11
12 a 17	Buenas	1.12 a 1.18
18 a 22	Aceptables	1.19 a 1.34
26 a 31	Pobres	1.35 a 1.45
35 a 38	Muy pobres	1.46 a 1.59
> 38	Extremadamente malas	> 1.60

Fuente: Secretaría de Salud, 2014.

Tabla 4. Índice de compresibilidad e índice de Hausner

**Table 2. Scale of Flowability<sup>2</sup>**

Compressibility Index (%)	Flow Character	Hausner Ratio
≤10	Excellent	1.00-1.11
11-15	Good	1.12-1.18
16-20	Fair	1.19-1.25
21-25	Passable	1.26-1.34
26-31	Poor	1.35-1.45
32-37	Very poor	1.46-1.59
>38	Very, very poor	>1.60

Fuente: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

- c) Velocidad de flujo: esta prueba también conocida en la USP como “flujo a través de un orificio” consiste en observar y calcular el tiempo que se tarda un polvo en salir, desde cualquier contenedor, a través de un orificio calculándose la masa por tiempo. Según la FEUM, “la capacidad que tienen los polvos para fluir depende de la resistencia que opone el polvo al movimiento diferencial entre las partículas” (Secretaría de Salud, 2014). Los principales factores que influyen en su flujo son el tamaño de partícula y la humedad. La velocidad de flujo de un polvo es una manifestación de sus propiedades reológicas, definiéndose como el desplazamiento de una cantidad de muestra por

unidad de tiempo. Las figuras 7 y 8 muestran el equipo Powder Flow Tester (PFT) de Brookfield para medición de la velocidad de flujo y la preparación de las muestras para su uso respectivamente.

Existen equipos denominados de celda de corte y reómetros que miden el flujo de los polvos con mayor precisión y exactitud y en condiciones más amplias (a varias fuerzas mecánicas de compactación del polvo) que un punto (equipo PFT). En el artículo “Impacto de la variación de lote de principio activo en el desempeño tecnológico y biofarmacéutico” Alcantara, 2018, menciona, que durante las pruebas que se le realizaron al valproato de magnesio, se aplicaron distintas fuerzas de compresión/corte al polvo; midiéndose la cantidad de fuerza necesaria para lograr la falla del molde ingresado dándoles como resultado una gráfica de fuerza de falla no confinada contra la fuerza principal de consolidación, siendo el valor de la pendiente el índice de flujo.

Figura 7. PFT de Brookfield.



Fuente: Laboratorio de Farmacia, Facultad de Química, UAEMex.

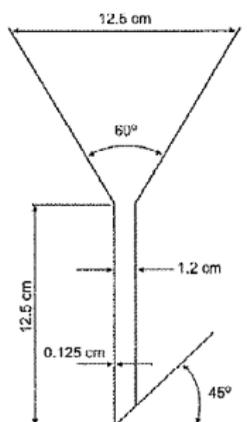
Figura 8. Preparación de muestras en el PFT



Fuente: Alcantara, 2018.

- d) **Ángulo de reposo:** el ángulo de reposo es la manifestación de la fricción entre partículas y su resistencia al movimiento. Se define según la FEUM como “aquel que corresponde al ángulo máximo formado entre la superficie de un cono de polvo y el plano horizontal” (Secretaría de Salud, 2014). El ángulo de reposo que se observa está en función de tres características principales, las cuales son forma, DTP y rugosidad de la superficie de las partículas del polvo o granulado. La figura 9 muestra un dispositivo para determinar el ángulo de reposo de un polvo farmacéutico mientras que la tabla 5 muestra los criterios para clasificar la capacidad de flujo de los diferentes polvos o granulados, existen tablas de referencia que toman en cuenta el ángulo de reposo

Figura 9. Embudo para determinar el ángulo de reposo



Fuente: Secretaría de Salud, 2014.

Tabla 5. Capacidad de flujo y su correspondiente ángulo de reposo.

Ángulo de reposo ( $\theta$ )	Capacidad de flujo
25° a 30°	Excelente
31° a 35°	Buena
36° a 40°	Adecuada (no necesita ayuda)
41° a 45°	Aceptable (puede demorarse)
46° a 55°	Pobre (es necesario someter a vibración)
56° a 65°	Muy pobre
> 66°	Extremadamente pobre

Fuente: Secretaría de Salud, 2014.

### *Pruebas físicas para tabletas*

- a) Friabilidad: la friabilidad o “índice de abrasión” es una propiedad mecánica útil para medir la capacidad que tienen los sólidos previamente compactados a resistir el desgaste por fricción durante la manipulación, envasado y transporte. Se inicia la prueba colocando en el interior del friabilizador una cantidad definida de unidades pesadas con exactitud, se cierra la tapa y se hace girar a  $25 \pm 1$  rpm durante 4 min. Se pasa la prueba si después del ciclo de rotaciones las unidades solo presentan pérdidas de masa correspondiente a un peso promedio no mayor que 1.0%. La figura 10 muestra un ejemplo de aparato para la determinación de la friabilidad.

Figura 10. Friabilizador Guoming CS-2



Fuente: Laboratorio de Farmacia, Facultad de Química, UAEMex.

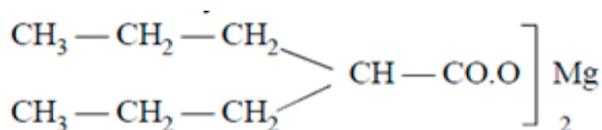
- b) Dureza: la resistencia a la ruptura es la fuerza necesaria para fracturar las tabletas y también es conocida como prueba de dureza. Es un ensayo farmacopeico que ayuda a pronosticar la integridad de las tabletas durante los procesos de fabricación (envasado y recubrimiento), mediante la determinación de la tensión o fuerza necesaria para romperlas. Esta prueba consiste en aplicar fuerza diametralmente a la tableta hasta fracturarla (Secretaría de Salud, 2014).
- c) Disolución: esta prueba, también denominada “prueba de velocidad de disolución aparente”, es un método farmacopeico (MGA 0291) para medir la liberación de un principio activo. Este MGA se emplea para determinar el cumplimiento de los requisitos de disolución en tabletas o cápsulas establecidos en la monografía individual, excepto para tabletas masticables (Secretaría de Salud, 2014).

## Valproato de magnesio

### *Estructura química*

La estructura molecular del valproato de magnesio (VMg) comprende 2 iones valproato unidos a 1 solo magnesio. La base; el valproato, es un ion orgánico pequeño. El ácido valproico tiene un grupo funcional ácido carboxílico de cinco carbonos en la cadena principal, que está sustituida por un grupo propilo en el carbono 2, su nombre químico es ácido 2-propilpentanoico. La molécula tiene un número CAS 99-66-1 y su solubilidad en agua es de 1.3 mg/ml (20 °C). La figura 11 muestra la estructura química del VMg (Mas-Bagà, 2006).

Figura 11. Estructura química del VMg



Fuente: Bathia, Srivastava, Rajender y Kumar, 2009.

### *Características fisicoquímicas*

El VMg ( $C_{16}H_{30}O_4Mg$ ) es una sal dibásica del ion bivalente  $Mg^{2+}$ . Es un polvo blanco cristalino higroscópico ligeramente soluble en agua, fácilmente soluble en heptano y metanol (Ambasana et al., 2011; Chemicals, 2010). Tiene una constante de disociación (pKa) reportada de 4.6 (Alcantara, 2018). La molécula tiene una temperatura de fusión de 220 °C, la cual es propicia para la fabricación de tabletas por vía húmeda, ya que soporta las temperaturas de secado habituales.

La sal magnésica del ácido valproico se comercializa en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata líquidas y sólidas; pueden encontrarse tabletas con recubrimiento entérico y de liberación retardada (Karde, Pawar, Geevarghese y Khatri, 2012).

### Farmacocinética

La actividad antiepiléptica del VMg ha sido demostrada en diversos modelos animales mediante estudios que concluyeron que el fármaco brinda protección contra las convulsiones inducidas por electrochoques y diversos agentes químicos, entre otros agentes (Bourgeois, 2006: 775). Además de las propiedades anticonvulsivantes, se han reportado efectos antimaniacos, antimigrañosos y, más recientemente, antineoplásicos (Bathia et al., 2009). El VMg es un fármaco antiepiléptico de amplio espectro, siendo uno de los medicamentos más usados en la población mexicana que presenta epilepsia, en especial en niños (Reséndiz, Aguirre, 2008).

Debido a su rápida absorción y al gran tiempo de vida media que posee (8-16 horas), así como el alto porcentaje de unión a proteínas (85-90%), se observan variaciones en los niveles plasmáticos en estado estacionario (Swarbrick, 2007). La sal magnésica es la que ofrece mayores ventajas fisicoquímicas en lo que respecta a baja solubilidad; por lo que hace que su absorción sea más lenta y de esta forma se disminuyan las variaciones en las fluctuaciones de los niveles plasmáticos (COFEPRIS, 2010). Así, aunque la absorción de la sal magnésica es más lenta, no se altera la fracción total del fármaco absorbida. Esto ha sido aprovechado para reducir las fluctuaciones en los niveles plasmáticos del fármaco observadas con otras sales cuya vida media es inferior a 24 horas.

La sal magnésica se absorbe fácilmente por vía oral, con una biodisponibilidad prácticamente de 100%, en un tiempo de 30-60 minutos y alcanza concentraciones plasmáticas máximas de ácido libre en un plazo aproximado de dos horas (1-4 horas); no experimentando metabolismo de primer paso hepático (Swarbrick, 2007). Ya en el torrente circulatorio, la sal de valproato se hidroliza rápidamente, fijándose de esta forma, altamente a las proteínas plasmáticas, con fracciones libres (Reséndiz, Aguirre, 2008).

El valproato penetra en los eritrocitos y atraviesa la barrera hematoencefálica, a través de la acción de un transportador específico; su biotransformación se lleva a cabo en el hepatocito después de reabsorberse en el túbulo renal, después continúan 2 fases: la oxidación, por la cual su estructura se hace más polar e hidrosoluble y la glucoronización.

El volumen de distribución de valproato es reducido, con valores entre 0.1 y 0.4 l/kg. Su depuración renal depende de la fracción libre del fármaco. El ácido valproico se metaboliza extensamente en el hígado por cuatro vías principales. Las tres primeras vías metabólicas del ácido valproico son comunes al metabolismo de ácidos grasos y están mediadas principalmente por procesos catalizados por enzimas del citocromo P-450 a productos que se excretan en la orina (Bathia et al., 2009).

Finalmente, la eliminación de valproato es a través de metabolismo hepático, mediante oxidación y conjugación, sólo 3-4% es excretado sin cambios.

### *Farmacodinamia*

Actualmente hay evidencia experimental de que el valproato incrementa el recambio (*turnover*) del ácido gamma-aminobutírico (GABA) potenciando de esa forma las funciones GABAérgicas en algunas regiones específicas del cerebro que se cree están implicadas en el control de la generación de las crisis y su propagación (Mas-Bagà, 2006).

Se sabe que la epilepsia se debe a descargas neuronales exageradas en las cuales hay una disminución importante del GABA (principal neuroinhibidor del SNC) mediante una inhibición de los canales de sodio voltaje-dependientes (Vademecum, 2007).

El mecanismo de acción del VMg aún se desconoce con exactitud, algunos autores han demostrado que el ácido valproico actúa inhibiendo la descarga neuronal y potenciando las acciones inhibitorias del GABA sobre la descarga neuronal. Existe también la teoría del efecto inhibitorio del GABA, aumentando la síntesis o una disminución de la degradación de este neurotransmisor; al actuar sobre la neurona de un modo directo, aumenta la cantidad de GABA cerebral; disminuye los niveles de aspartato cerebral con aumento de GABA, protegiendo al paciente contra crisis audiógenas (Swarbrick, 2007).

## METODOLOGÍA

Se elaboró un granulado base de principio activo farmacéutico al 80% de concentración (GAPI 80/20), y se caracterizó. Se realizaron mezclas del GAPI 80/20 con seis diferentes polímeros para la formación de hidrogeles distintos y se comprimieron y evaluaron. La metodología general se muestra en la figura 12.

Figura 12. Metodología general del proyecto



Elaboración propia

### Preparación GAPI 80/20

Las mezclas para compresión se prepararon tomando como punto de partida el granulado base con el principio activo al 80% con dos excipientes que se mantuvieron constantes un diluyente y un aglutinante, de acuerdo a la fórmula indicada en la tabla 6. A este granulado se le denominó GAPI 80/20.

Tabla 6. Composición de la premezcla del GAPI 80/20

<i>Función en la fórmula</i>	<i>Ingrediente</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Principio activo	Valproato de magnesio	80
Diluyente	Celulosa microcristalina PH 101	17
Aglutinante	PVP K30	3

Elaboración propia.

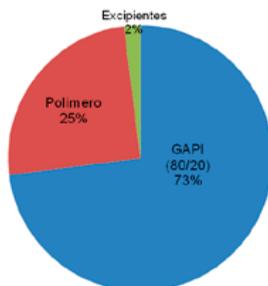
En un mezclador en V (o de pantalón) se mezclaron a 16 rpm por 5 minutos el principio activo (80%) y la celulosa microcristalina (Avicel pH 101) (17%). A esta mezcla se le asperjó una solución acuosa al 3% de polivinilpirrolidona (PVP) K-30 hasta llegar al punto de granulación. Se tamizó el GAPI 80/20 en una malla número 16 US estándar y se dejó secar en la estufa por 120 minutos a una temperatura de 50 °C, hasta obtener un porcentaje de pérdida de masa menor al 2%.

#### Fabricación de tabletas

Se mezcló GAPI 80/20 con el polímero correspondiente al diseño experimental (HPC de grado VH, HRP, SL ó HPMC de grado K100LV, K4M, K15M) (ver análisis estadístico) y se mezcló en un mezclador de pantalón por 10 minutos a 20 rpm. Se lubricaron las muestras con estearato de magnesio y talco conforme a la fórmula abajo descrita, por 5 minutos a 20 rpm. La composición final de las tabletas fue de 25% polímero, 73% GAPI 80/20 y 2% mezcla de lubricantes (figura 13). La composición final de las tabletas de VMg se ve en la tabla 7.

La cantidad de excipientes empleados se determinó considerando que el principio activo es cohesivo y presenta adhesión en las paredes del contenedor, atendiendo las recomendaciones de uso para ellos: celulosa microcristalina (20.00 a 90.00%), estearato de magnesio (0.25 a 5.00%) y talco (1.0% a 10.00%) indicadas en el Handbook of Pharmaceutical Excipients (Rowe, 2009).

Figura 13. Composición de las tabletas de valproato de magnesio



Elaboración propia.

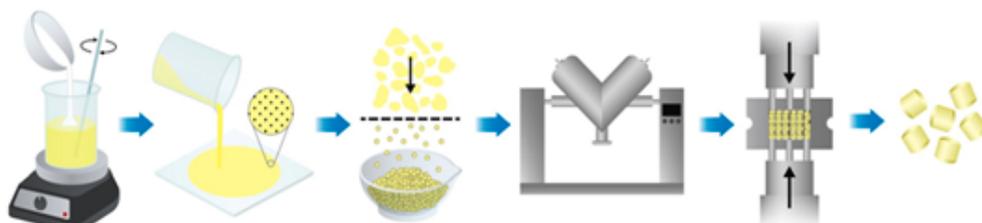
Tabla 7. Composición de las tabletas de valproato de magnesio

Materia prima	mg/tableta	%	g/lote
Valproato de magnesio	400	58.39	204.38
PVP K30	15	2.19	7.66
Avicel pH 101	85	12.41	43.43
Polímero	171.3	25.01	87.53
Talco	6.85	1	3.50
Estearato de magnesio	6.85	1	3.50
<b>Total</b>	<b>685mg</b>	<b>100</b>	<b>350</b>

Elaboración propia.

Se comprimieron las mezclas en una tableteadora rotativa piccola de 10 estaciones a una fuerza de compresión constante y con punzones de 12 mm de diámetro a un peso final de 685 mg. El diagrama 2 muestra el proceso para la elaboración del granulado ocupado para la elaboración de las tabletas, observando que al VMg se le añade un aglutinante (PVP-K30) y un diluyente (Avicel PH 101), se procede a su granulación, se deja secar, se mezcla con lubricantes y se tabletea.

Figura 14. Proceso para la elaboración de tabletas por vía húmeda



Los pasos del proceso, de izquierda a derecha, son: preparación de la dispersión aglutinante, amasado, granulación en tamiz (incluye secado), mezclado final (lubricado), tableteo, producto final.

Elaboración propia.

## Pruebas físicas en procesos de fabricación de formas farmacéuticas

### *Evaluación del GAPI 80/20*

Las pruebas físicas que se llevaron a cabo se eligieron en base a dos criterios; el primero, considerando las técnicas comúnmente empleadas durante el proceso de desarrollo y fabricación de formas farmacéuticas para determinar las propiedades reológicas de sólidos pulverizados a través de métodos sencillos, pero de relevancia en la industria farmacéutica. En segundo lugar, se consideraron pruebas que, si bien son farmacopeicas, no están descritas en las monografías individuales de las materias primas o productos intermedio y terminado, pero que son notables en tanto aportan información determinante sobre los materiales.

Las pruebas que se determinaron para evaluar los granulados son: DTP (USP 786), índice de compactación (FEUM MGA 1031), velocidad de flujo (FEUM MGA 1061) y ángulo de reposo (FEUM MGA 1061).

### Evaluación de las tabletas

#### *Pruebas físicas*

Las pruebas físicas para tabletas fueron friabilidad en un fragilizador GUOMING CS-2 y fuerza de ruptura en un durómetro marca ERWEKA.

#### Pruebas fisicoquímicas: perfil de disolución de las tabletas

Se determinó el perfil de disolución de las tabletas por triplicado en un disolutor SOTAX AZT adaptado con el aparato 2 (paletas) a 75 rpm y 900 ml de fluido intestinal simulado (Secretaría de Salud, 2014), para cada uno de los 6 lotes (FEUM MGA 0291). Se obtuvieron muestras a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas tomando alícuotas de 5 ml de cada vaso, con reposición de medio. Se determinó la liberación de valproato de magnesio mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta

presión (HPLC, por sus siglas en inglés) utilizando una columna CAPCELL PAK Phenyl de tamaño 4.6 mm x 150 mm a una longitud de onda de 210 nm. A continuación, se describe la preparación del medio de disolución y la fase móvil.

#### Cuantificación del valproato de magnesio por HPLC

- a) Preparación de solución amortiguadora de fosfatos: pesar 2.76 g de fosfato monosódico y aforar a 1l de agua deionizada c.s.p. (antes de aforar obtener el pH de 2.4 a 2.5; si se requiere, ajustar con ácido fosfórico al 85%).
- b) Preparación de fase móvil: buffer de fosfatos pH 2.5 + acetonitrilo (proporción 1:1). Pasar por membrana 0.45 micras y degasificar por vacío durante 10 min.
- c) Preparación de los estándares (STD): pesar por duplicado 25.0 mg de valproato de magnesio (STD1 y STD2); transferirlos a un matraz aforado de 50 ml y aforar con fluido intestinal como diluyente.  
1) % de recobro: será el área del (STD2 \* Peso del STD1)/Promedio del área del (STD1 \* el peso del STD2). El resultado deberá de estar entre el 98% y 102% para poder ser válido; si no es así, descartar y volver a pesar estándares.
- d) Correr en el vial 1 del HPLC como blanco fluido intestinal, hacer 9 blancos para poder tener nuestra línea base.
- e) Colocar en los viales 2 y 3 los estándares STD1 y STD2, respectivamente.
- f) Colocar a partir del vial 4 las muestras a analizar.
- g) Se calculó la concentración del valproato de magnesio (mg/ml) mediante la fórmula siguiente.

$$\frac{(\text{Peso del STD1} / 50\text{ml}) (\text{volumen de aforo con fluido intestinal}) * \text{área de la muestra}}{1 (\text{M1})}$$

Promedio de área del pico en el cromatograma del STD

#### Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó como análisis estadístico de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) aplicado a los resultados de un diseño de experimento factorial  $2^k$  el cual permite

observar cómo dos niveles (HPMC y HPC) influyen en la variable de respuesta de disolución. El modelo empleado fue un estudio  $2^k$  con 3 niveles de significancia (tres viscosidades por cada tipo de polímero empleado), quedando finalmente el modelo  $2^1 * 3^1$ . Los datos se analizaron en un software *Statgraphics Centurion XIV*.

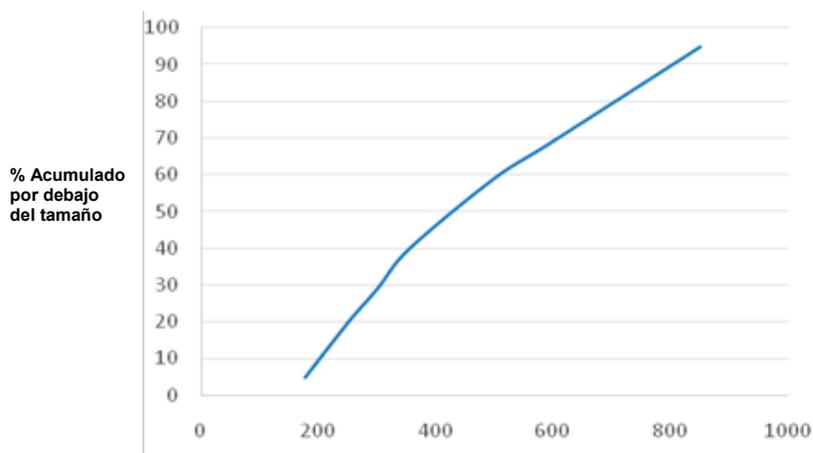
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación reológica del GAPI 80/20

#### *Distribución de tamaño de partícula*

La DTP muestra que la mayor cantidad del granulado (26.2% retenido) es retenido en la malla 30, cuyo diámetro aproximado es de 595  $\mu\text{m}$ . Este tamaño está clasificado como un granulado grueso (USP). El resultado de la DTP muestra que la curva va de 200 a más de 700 micrómetros, por lo que es bastante amplia. Sin embargo, en esta prueba muestra que más del 55% del granulado tiene un tamaño de entre 350 y 600 micrómetros y que menos del 10% de la muestra está conformada por polvos menores a 177 micrómetros.

Figura 14. DPT acumulada del GAPI 80/20



Elaboración propia.

### *Índice de compactación del GAPI 80/20*

El resultado de índice de compactación (IC) fue obtenido a partir de los datos de densidades aparente (DA) y compactada (DC). Los valores del índice de compresibilidad (IC) e índice de Hausner (IH) obtenidos fueron de 8.24% y 1.089, respectivamente. El índice de compresibilidad está dentro del intervalo de 5 a 11, que es la categoría considerada por la FEUM como propiedades de flujo excelentes (Secretaría de Salud, 2014).

### *Velocidad de flujo*

Los resultados de la prueba de velocidad de flujo realizada por triplicado dan un promedio de 4.144 g/s. Este valor, al igual que los índices de Hausner y de compresibilidad, muestra que el GAPI 80/20 tiene un flujo clasificado como excelente de acuerdo a la FEUM (Secretaría de Salud, 2014).

### *Ángulo de reposo*

Los resultados de la prueba de ángulo de reposo realizada por triplicado, dan un promedio de  $\Theta = 31.55$ , lo que indica que el GAPI 80/20 tiene un flujo clasificado como bueno según la FEUM (Secretaría de Salud, 2014).

## Evaluación de las tabletas fabricadas

### *Friabilidad*

Se determinó, por triplicado, la friabilidad de todos los lotes de tabletas fabricados obteniendo los siguientes valores: HPC VH = 0.371561%; HPC HRP = 0.486386; HPC SL = 0.458351; HPMC K100 LV = 0.585697; HPMC K4M = 0.204488; HPMC K15 M = 0.460242. En todas las fórmulas se observa que el promedio de friabilidad es menor al 1.0% de pérdida, por lo que todas las tabletas cumplen con la

especificación de friabilidad, que suele ser menor al 1.0% (Secretaría de Salud, 2014). Los comprimidos de HPMC que presentaron un menor porcentaje de pérdida fueron los de K4M; los de HPC VH fueron los de menor valor.

### Resistencia a la ruptura

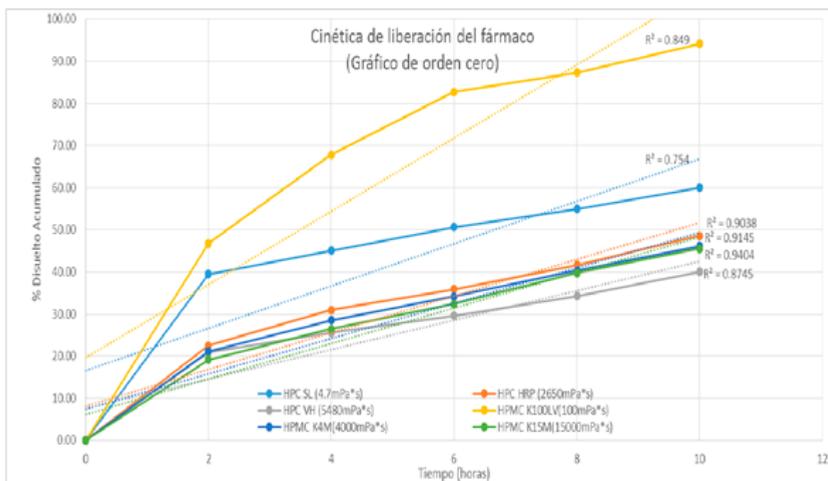
Dado que todas las tabletas se comprimieron en el mismo punzón y por lo tanto tienen la misma forma y tamaño, se registró la dureza de las tabletas ( $n=10$ ); aunque en un sentido estricto es mejor utilizar este valor para obtener la tensión a la ruptura. Para todos los casos, la dureza resultante de las tabletas está entre los 9 y 12 Kp; todos los valores pueden considerarse aceptables para una tableta de 12 mm de diámetro. En las condiciones de compresión a las que se trabajó, las tabletas fabricadas con HPMC K15M presentaron valores de dureza ligeramente más altos, pero con mayor variación (del orden de 2 Kp) que el resto de los polímeros evaluados. Las tabletas de HPMC K4M presentaron una desviación estándar de 0.1006 observando que su rango de variación fue menor que las tabletas de HPMC K15M las cuales obtuvieron una desviación estándar de 1.009 indicando un rango de valores amplio para este polímero.

### Prueba de disolución

La prueba de disolución de las tabletas muestra que el polímero del tipo HPMC con más rápida liberación es el HPMC K100LV, seguido del K4M y (a menor distancia) del K15M. Estos valores corresponden con las viscosidades de estos materiales, de las cuales depende la velocidad de liberación del fármaco. Lo mismo sucede con los polímeros del tipo HPC; el que libera con mayor rapidez corresponde al HPC SL, que es el de menor viscosidad, seguido por los HPC HRP y HPC VH, cuya diferencia en viscosidades es de poco más de 2000 mPa\*s. La figura 16 (a, b y c) muestran la cinética de liberación de las matrices fabricadas y la tabla 8 exhibe los valores de  $r$  cuadrada aplicada a tres modelos matemáticos aplicables a cinéticas de liberación de fármacos.

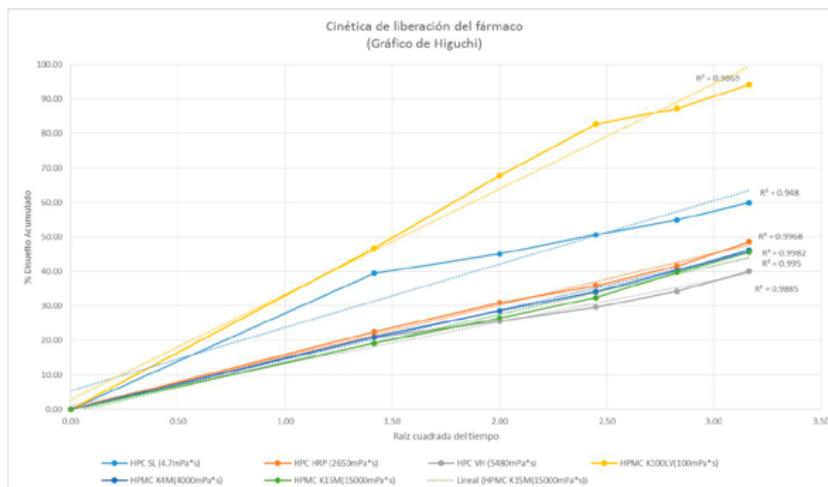
**Figuras 15a, 15b y 15c. Gráficas de cinética de liberación de valproato de magnesio en matrices hidrofílicas fabricadas con seis diferentes polímeros: a) orden cero, b) Higuchi y c) Korsmeyer-Peppas.**

15a



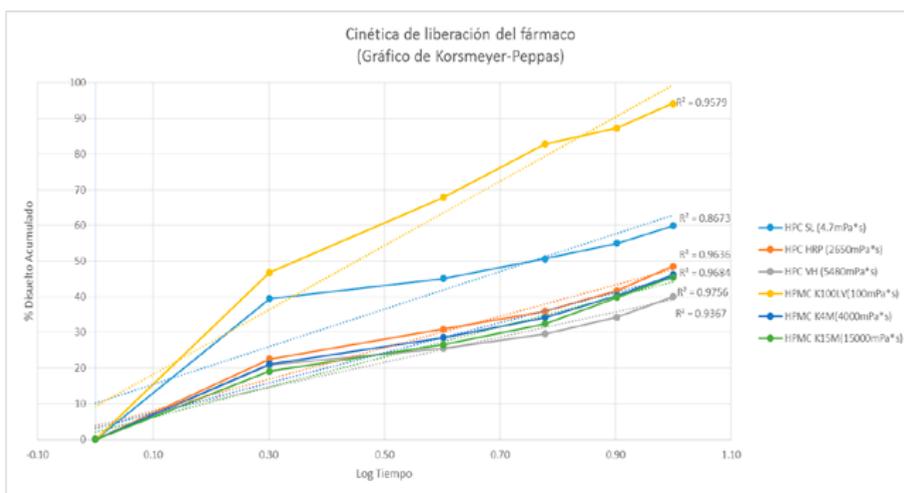
Elaboración propia.

15b



Elaboración propia.

15c



Elaboración propia.

**Tabla 8. Coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de los modelos matemáticos evaluados para la liberación del valproato de magnesio en las matrices evaluadas: orden cero, Higuchi y Kormsmeier-Peppas.**

Modelo matemático	R2					
	HPC SL (4.7mPa*s)	HPC HRP (2650mPa*s)	HPC VH (5480mPa*s)	HPMC K100LV(100mPa*s)	HPMC K4M(4000mPa*s)	HPMC K15M(15000mPa*s)
Orden cero	0.7540	0.9038	0.8745	0.8490	0.9145	0.9404
Higuchi	0.9480	0.9968	0.9885	0.9869	0.9982	0.9950
Kormsmeier-Peppas	0.8673	0.9636	0.9367	0.9579	0.9684	0.9756

Elaboración propia.

Según el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) obtenido después de ajustar los modelos matemáticos, podemos apreciar que el modelo de orden cero no es el más apropiado para describir la liberación de valproato de magnesio en las matrices elaboradas. El modelo de orden cero describe sistemas de liberación controlada por la relajación de cadenas poliméricas. En este estudio el modelo que más se ajusta para describir la liberación del principio activo en todos los polímeros evaluados es el de Higuchi, que justamente describe la liberación de un sistema matricial en el que predomina la difusión del fármaco a través de la matriz y no la erosión o relajación de las cadenas poliméricas. Sin embargo, hay que considerar las limitaciones del modelo, que se basa

en las hipótesis de que a) la concentración inicial de fármaco en la matriz es mucho mayor que la solubilidad del fármaco, b) la difusión del principio activo sucede únicamente en una dimensión, c) las partículas de fármaco son mucho menores que el espesor del sistema, d) el hinchamiento matricial y la disolución son despreciables, d) la difusividad del fármaco es constante y d) en todo momento se conservan las condiciones sink en la prueba.

Los promedios del % disuelto confirman los valores esperados con base en las viscosidades de los polímeros evaluados. Sin embargo, dado que en este trabajo es de especial interés conocer la medida de dispersión de los valores de la cantidad de valproato disuelto en cada horario de muestreo y de la cantidad acumulada en las 10 horas de duración de la disolución, se compararon los valores de desviación estándar promedio (DEP) de cada polímero y la desviación estándar (DE) observada en cada hora muestreada en la prueba de disolución. Los resultados se muestran en la tabla 8 y la gráfica 4.

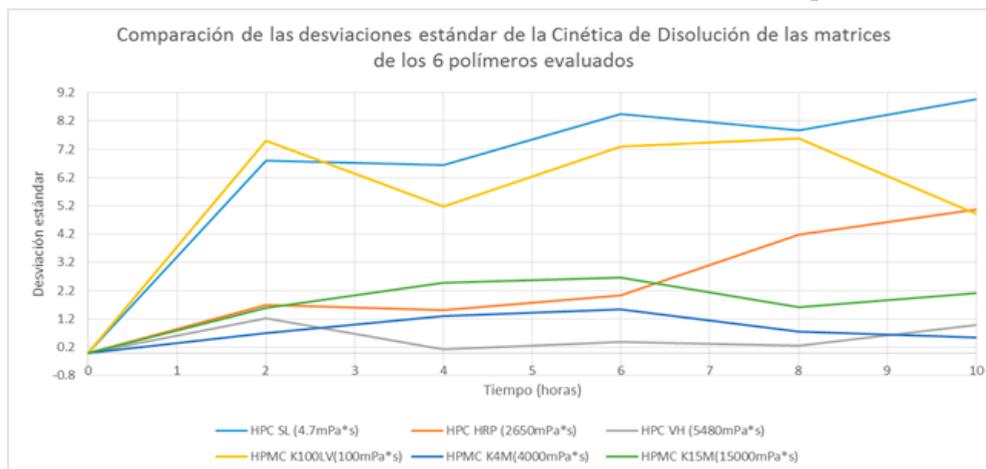
**Tabla 9. Desviación estándar promedio por polímero empleado**

	HPC SL (4.7mPa*s)	HPC HRP (2650mPa*s)	HPC VH (5480mPa*s)	HPMC K100LV(100mPa*s)	HPMC K4M(4000mPa*s)	HPMC K15M(15000mPa*s)
DS Promedio	7.75	2.89	0.59	6.49	0.97	2.10

Elaboración propia.

Como puede observarse, los valores más elevados de DEP los tienen los dos polímeros de baja viscosidad: el HPC SL (*super low*) y el HPMC K100LV (*low viscosity*), mientras que el resto de los polímeros muestra valores de DE por debajo de 3.0.

Figura 16. Comparación de la magnitud de la dispersión estadística de la cinética de liberación (2, 4, 6, 8 y 10 horas) de matrices hidrofílicas fabricadas con seis diferentes polímeros.



Elaboración propia

Los valores de DS obtenida en cada uno de los cinco tiempos de muestreo tomados en la prueba de disolución para cada polímero se analizaron con un nivel del 95% de confianza mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) realizado en un programa estadístico Statgraphics Centurion XIV ( $p = 0.05$ ). Con este tratamiento estadístico, se observa que el polímero con una DE significativamente menor fue el HPC VH, seguido del HPMC K4M; de hecho, ambos están considerados dentro de un mismo grupo homogéneo que se distingue de los demás polímeros.

Las pruebas de rangos múltiples y de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher aplicadas a los valores de las DE para estudiar el efecto del polímero, muestran que existen diferencias significativas entre los valores medios de todos los polímeros estudiados, excepto para cuatro grupos. Estos cuatro grupos homogéneos son las parejas siguientes: HPC SL y HPMC K100 LV; HPMC K15M y HPMC K4M; HPC VH y HPMC K4M; y HPC HRP y HPMC K15M.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en los resultados de las pruebas físicas de las tabletas (friabilidad y fuerza de ruptura). Los valores obtenidos en la prueba de disolución de las tabletas corresponden con las viscosidades de estos materiales, de las cuales depende la velocidad de liberación del fármaco. En este estudio el modelo que más se ajusta para describir la cinética de liberación del valproato de magnesio en las matrices de los polímeros evaluados es el de Higuchi.

El análisis de las DEP mostró que existen diferencias estadísticamente significativas en la variación intertableta medida como la desviación estándar de la prueba de disolución de las matrices fabricadas con seis polímeros diferentes. Se encontró la mayor DEP en las tabletas fabricadas con polímeros de baja viscosidad, con independencia del tipo de polímero (HPC o HPMC) estudiado. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de DE de los dos polímeros distintos (HPC y HPMC) para valores bajos de viscosidad (igual o menor a 100 mPa\*s); resulta lógico que los polímeros HPC SL y HPMC K100 LV presentaran las mayores variaciones inter-tableta en la prueba de disolución, dado que son materiales de viscosidad baja, que por lo tanto no son idóneos para la fabricación de hidrogeles de liberación prolongada.

No se encontraran diferencias entre las DE de los polímeros de HPMC del mismo tipo químico (K) y con viscosidades altas, los cuales son materias primas aptas para la fabricación de matrices hidrofílicas de liberación controlada. Es interesante notar que tampoco las hay entre los polímeros HPC VH y HPMC K4M y que en cambio sí existen tanto entre el HPC VH y el HPMC K15M como entre el HPC HRP y el HPMC K15M.

En cambio, sí existen diferencias estadísticamente significativas entre la variación producida por los dos grados de HPC de altas viscosidades (del orden de los miles 2650 y 5480 mPa\*s), siendo el HPC VH el polímero con la variación más baja de todos los evaluados.

## CONCLUSIÓN

No se encontró un impacto significativo en los valores de fuerza de ruptura y friabilidad de las tabletas fabricadas con los seis polímeros distintos. Los valores obtenidos en la prueba de disolución de las tabletas corresponden con las viscosidades de estos materiales, de las cuales depende la velocidad de liberación del fármaco, lo que confirma que el peso molecular del polímero modifica la viscosidad del hidrogel y ésta a su vez regula la liberación del principio activo. El modelo matemático que describe la cinética de liberación del valproato de magnesio en las matrices de todos los polímeros evaluados es el de Higuchi, por lo que se concluye que predomina la difusión del fármaco y no la erosión de la matriz.

Los resultados del análisis de la variación intertableta muestran que no existen diferencias en la variación intertableta entre el HPC y HPMC. En polímeros de alta viscosidad, se encuentra que tanto el HPC VH como el HPMC K4M tienen los valores más bajos de variación intertableta, y ambos son los mejores polímeros formadores de matrices tanto por su baja variación intertableta como por su alta capacidad de retención del fármaco. Para polímeros de baja viscosidad. En suma, de acuerdo a los resultados, no es posible generalizar menores variaciones intertableta entre matrices de HPC y HPMC atribuibles únicamente a la naturaleza del polímero empleado. Se sugiere ampliar el estudio a otros tipos químicos y tamaños de partícula de ambos polímeros.

Como prospectiva a este estudio está comparar los resultados obtenidos a partir de las formulaciones aquí planteadas con las del medicamento innovador, pensando en que para los laboratorios farmacéuticos de medicamentos genéricos será útil integrar esta información con el perfil de liberación del medicamento de referencia.

## REFERENCIAS

- Alcantara, E. T., 2018. *Impacto en la variación de lote de principio activo en el desempeño tecnológico y biofarmacéutico de una forma farmacéutica sólida oral*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ambasana, M. A.; Kaila, H. O.; Thakkar, R. S.; Saravaia, H. T. y Shah, A. K., 2011. Validation of an analytical method for assay of magnesium valproate by gas chromatography. *International Journal of ChemTech Research*, 3 (1), 342-347.
- Arredondo, A., 2009. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica* [en línea], 3 (5), 83-94. Disponible en: <https://doi.org/10.24050/19099762.N5.2009.70>
- Ashland, I., 2017. *Klucel hydroxypropylcellulose: Physical and chemical properties*. Covington, USA.
- Bathia, M. S.; Srivastava, S.; Rajender, G. y Kumar, P., 2009. Magnesium valproate. *Delhi Psychiatry Journal* [en línea], 12 (1), 126-132. Disponible en: <https://doi.org/10.2165/00128415-201012990-00076>
- Chemicals, R., 2010. Roaq Chemicals PVT LTD.
- COFEPRIS, 2010. Estudio de bioequivalencia en estado estable.
- Costa, E.; Arancibia, A. y Aïache, J. M., 2004. Sistemas matriciales. *Acta Farmacéutica Bonaerense* [en línea], 23 (2), 259-265. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dow, 2000. *Using METHOCEL cellulose ethers for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems*. *Using METHOCEL cellulose ethers for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems* [en línea], Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00262-011-0972-z>
- Karde, M.; Pawar, H.; Geevarghese, R. y Khatri, J., 2012. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of valproic acid in dissolution study of its formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (1), 6-11.
- Lastres, J. L., 2002. Nuevos sistemas orales de liberación modificada. *Schironia*, 1 (1), 63-71.
- Mas-Bagà, M., 2006. Farmacología básica del valproato: revisión tras 35 años de uso clínico para tratamiento de la epilepsia. *Revistas de Toxicomanía*, 47 (1), 11-33.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005. *Real Farmacopea Española* Madrid, España.
- Nakamatsu, J., 2002. Matrices poliméricas para liberación controlada de sustancias activas. *Revista de Química*, 16 (1-2), 13-23.

- Nisso H. P. C., 2012. *High viscosity grade of hydroxypropyl cellulose (HPC-H) for hydrophilic matrix, sustained release formulation* [en línea], 1-2. Disponible en: [http://www.nissoexcipients.com/pdf/matrix\\_appnote\\_cr2012aaps.pdf](http://www.nissoexcipients.com/pdf/matrix_appnote_cr2012aaps.pdf)
- Pertuso, S.; Navarro, G. y Cabral, P., 2007. Matrices hidrofílicas como agentes moduladores de liberación de fármacos. *Salud Militar*, 29 (1), 9-17.
- Reséndiz, J. C.; Aguirre, E., 2008. Epilepsia, magnesio y valproato. Artículo de revisión epilepsia y antiepilépticos. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9 (3), 206-214.
- Rowe, R. C., 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients. Handbook of Pharmaceutical Excipients* [en línea], 6 (40). Estados Unidos. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sánchez, R.; Damas, R.; Domínguez, P. y Cerezo, P., 2010. Uso de la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos. *Farmespaña Industrial*, 1 (1), 48-51.
- Secretaría de Salud, 2014. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Comisión, Mexico.
- Silva, G., 2012. Desarrollo de tabletas de liberación prolongada de diclofenaco sódico a partir de una matriz hidrofílica, 121.
- Swarbrick, J., 2007. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* [en línea], New York. Disponible en: <https://doi.org/10.1081/E-EPT-100001705>
- United States Pharmacopeial Convention, 2007. *United States Pharmacopeia*, United States.
- Vademecum, 2007. Valproato de magnesio.
- Wildenow, L., 2013. *European Pharmacopoeia*.

# CICLOADICIONES (3 + 2) AZIDA-ENOLATO COMO HERRAMIENTA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS: SÍNTESIS DE ANÁLOGOS NUCLEOSÍDICOS Y DEL MICONAZOL

*Davir González Calderón*<sup>1</sup>

*Aydeé Fuentes Benítez*<sup>1</sup>

*Carlos González Romero*<sup>1\*</sup>

El diseño y síntesis de compuestos bioactivos asistido por la síntesis orgánica para su posterior evaluación biológica ha sido un continuo quehacer de la química medicinal. En este capítulo, los autores describen novedosos métodos sintéticos para la obtención del núcleo del heterociclo 1, 2, 3-triazol (farmacóforo ampliamente reconocido en la farmacología) investigando su reproducibilidad y alcance en distintos sustratos (grupos funcionales), para posteriormente demostrar su aplicación en la síntesis de nuevas sustancias bioactivas (análogos del miconazol y derivados nucleosídicos), sustancias que fueron evaluadas biológicamente por estudios *in vitro* antimicóticos.

## INTRODUCCIÓN

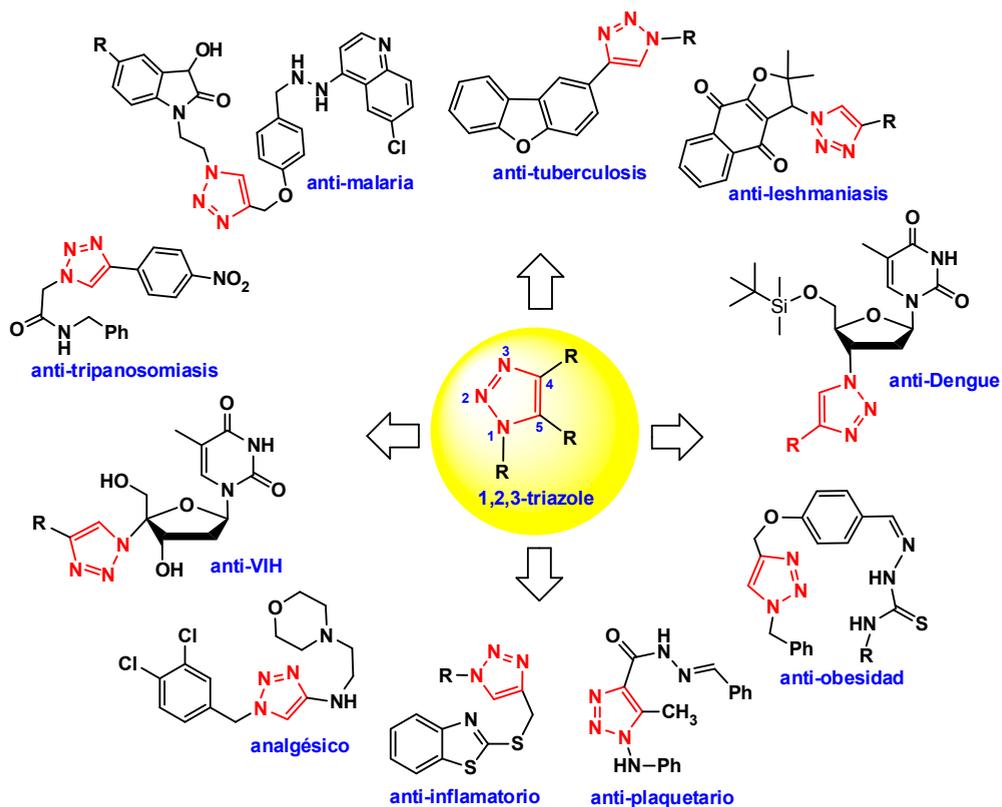
El sistema de anillo de 1, 2, 3-triazol es un farmacóforo importante (Agalave et al., 2011) en la química medicinal. Este heterociclo nitrogenado es muy conocido por su amplia gama de actividad terapéutica y biológica (Zhou et al., 2012), (figura 1) como tratamiento contra la malaria (Kumar et al., 2014), tuberculosis (Yempala et al. 2014), tripanosomiasis (Andrade et al., 2015), leishmaniasis (Guimaraes et al., 2013), VIH (Vernehar et al., 2014), dengue (Vernekar et al., 2015), dolor (analgésico) (Díaz et al., 2015), obesidad (Kinfe et al., 2013), inflamación (Shafi et al., 2012), así como su uso como agente antiplaquetario (Jordão et al., 2009), entre otras aplicaciones (Massarotti et al., 2014).

---

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México.

\* cgonzalezr@uaemex.mx

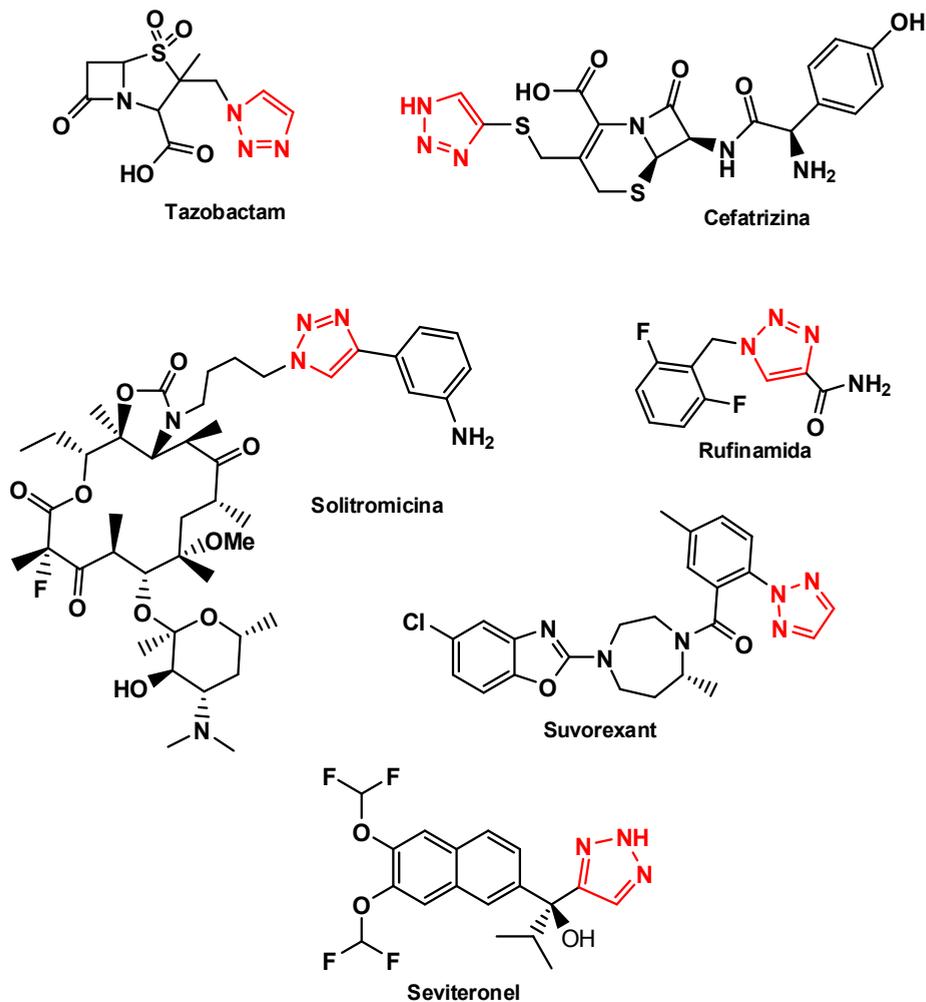
Figura 1. Núcleo del 1, 2, 3-triazole, farmacóforo ampliamente reconocido en la química medicinal



Elaboración propia.

Así mismo, algunos otros compuestos han sido aprobados por la FDA (figura 2), actualmente ya comercializados, tal es el caso del tazobactam, Cefatrizina y salitromicina (antibacterianos), así como la rufinamida (antiepiléptico), suvorexant (antiinsomnio) o el seviteronel (anticancerígeno). Por lo tanto, las investigaciones sobre métodos sintéticos para obtener núcleos de 1, 2, 3-triazoles son cada vez más comunes en la literatura.

Figura 2. Compuestos comerciales (aprobados por la FDA) que contienen el núcleo del triazol

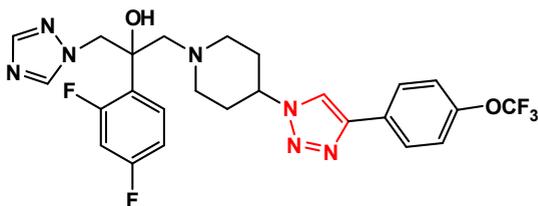
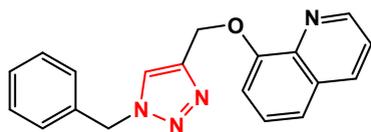


Elaboración propia.

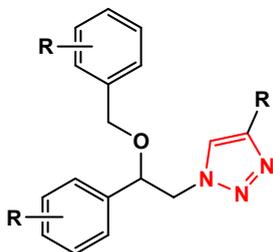
Por otro lado, el estudio de 1, 2, 3-triazoles en la síntesis de antifúngicos (Irfan et al., 2015; Jiang et al., 2014) y muy particularmente de análogos del miconazol (Pericherla et al., 2012; Kim et al., 2012) así como análogos nucleosídicos (Reddy et al., 2010) ha representado un campo continuo de investigación en los últimos años (figura 3).

Figura 3. El estudio de 1, 2, 3-triazoles para la síntesis de antifúngicos y muy particularmente de análogos del miconazol así como análogos nucleosídicos ha representado un campo continuo de investigación en los últimos años

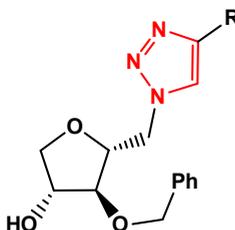
**Derivados triazólicos antifúngicos:**



**Análogos del miconazol:**



**Análogos nucleosídicos:**



Elaboración propia.

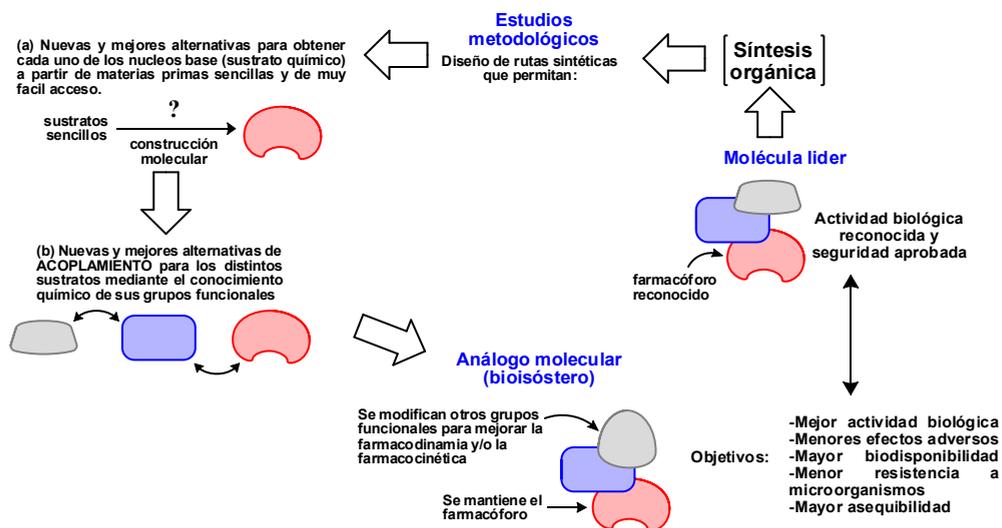
Las enfermedades micóticas ya se reconocen como un problema de salud pública a nivel mundial con mayores tendencias y de incidencia para todas las clases sociales (Benedict et al., 2017; Vallabhaneni et al., 2015). Dicho problema se ve aún más afectado por la resistencia farmacológica de los microorganismos fúngicos (Wiederhold 2017; Perlin et al., 2017; Fisher et al., 2018; Kontoyiannis, 2017). Este hecho ha obligado a la química orgánica medicinal a una continua y obligada búsqueda de nuevos agentes antifúngicos.

Dentro de los desafíos en el diseño de medicamentos, una estrategia utilizada por el químico medicinal es la modificación racional de compuestos líderes (fármacos de patente) en agentes más seguros y clínicamente más eficaces, esto es, la obtención de bioisómeros (figura 4). Un bioisómero se puede considerar como un compuesto resultante del intercambio de un átomo o grupos de átomos (fracción molecular) por otro muy similar. El objetivo de un reemplazo bioisotérico es crear un nuevo compuesto con propiedades biológicas similares o mejores al compuesto original para

así mantener o mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (Brown et al., 2012; Yao et al., 2017; Moreira Lima et al., 2005; Patani et al., 1996).

Los autores de este trabajo han incursionado en la solución de los problemas antes mencionados mediante la modificación estructural de fármacos líderes (síntesis de sus correspondientes análogos).

Figura 4. El objetivo de un reemplazo bioisotérico es crear un nuevo compuesto con propiedades biológicas similares o mejores al compuesto original



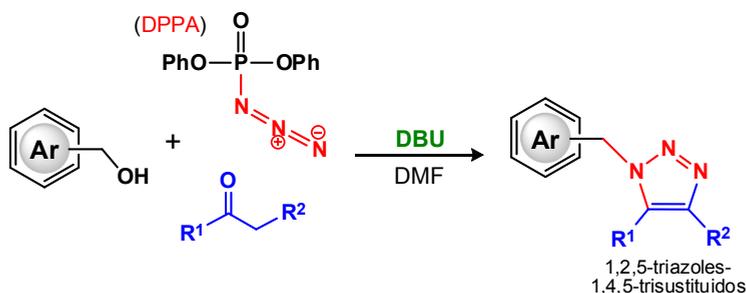
Elaboración propia.

La cicloadición alquino-Azida catalizada por cobre (CuAAC, o comúnmente llamado Click Chemistry) ha sido el método tradicional para obtener 1, 2, 3-triazoles la cual ha sido estudiada y optimizada ampliamente durante los últimos años (véase los siguientes *reviews* para un amplio entendimiento: Singh et al., 2016; Totobenazara y Burke, 2015; Haldón et al., 2015; Hein y Fokin, 2010; Meldal y Tornøe, 2008; Wu y Fokin, 2007; Bock et al., 2006), y su versatilidad se ve reflejada por sus aplicaciones en otros campos, tales como la química medicinal (Pickens, 2018; Thirumurugan et al., 2013; Amblard et al., 2009; Hein et al., 2008) (figura 5). Por otro lado, la cicloadición azida-enolato 1, 3-dipolar ha emergido recientemente como otra alternativa para acceder a tales heterociclos nitrogenados (véase los siguientes *reviews*



difenilfosforilazida (DPPA) y cetonas activas (benzoilacetnitrilo, acetoacetato de etilo, dibenzoilmetano y acetilacetona) permitieron la cicloadición azida-enolato (3 + 2) mediante el uso de 1, 8-diazabicyclo [5.4.0]-7-undeceno (DBU) como base (figura 6). Es así que el alcance de la metodología se demostró mediante la identificación espectroscópica y espectrométrica de diecisiete ejemplos. Dichos alcances permitieron observar el uso de alcoholes bencílicos aromáticos como de algunos heterociclos, así como el uso de alcoholes bencílicos primarios como secundarios.

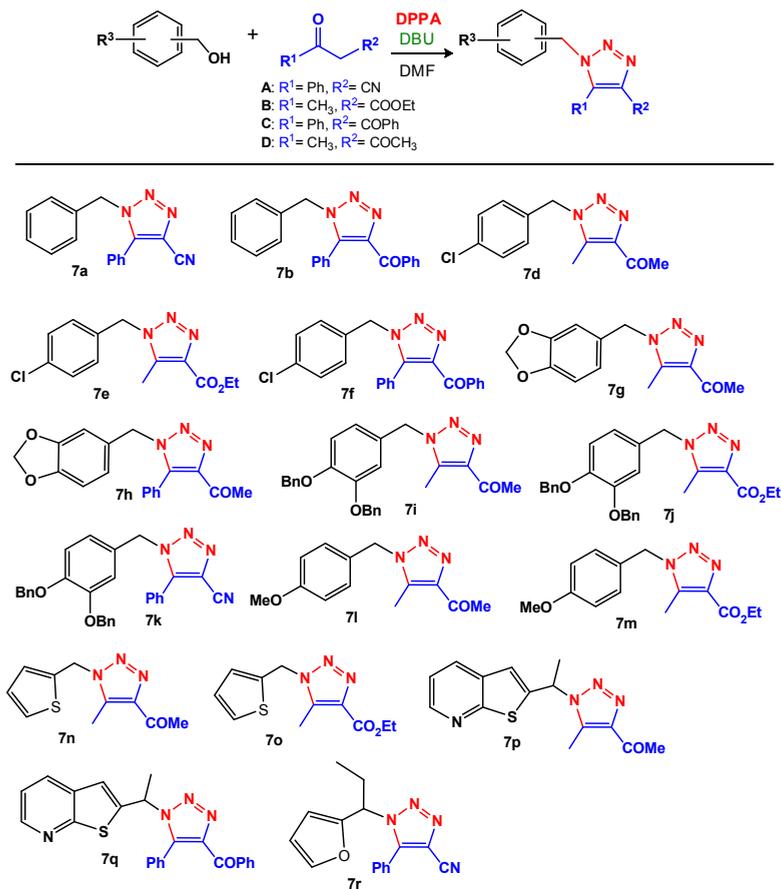
Figura 6. Síntesis de 1, 2, 5-triazoles-1, 4, 5-trisustituídos a partir de alcoholes bencílicos



Elaboración propia.

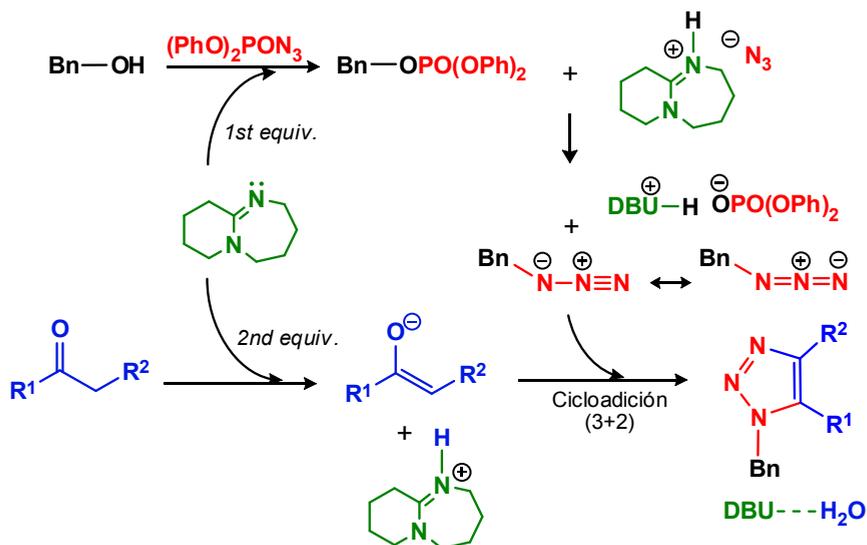
En esta etapa de los estudios, aun no es posible para los autores defender y definir un mecanismo de reacción; sin embargo, en el figura 7, se propone una posible ruta en cuatro pasos. Un equivalente de DBU es necesario para una azidación efectiva, entonces el enolato generado *in situ* por la acción de un segundo equivalente DBU conduce a la cicloadición azida-enolato (3 + 2).

Figura 7. Se demostró la reproducibilidad de la metodología, obteniendo así diecisiete ejemplos que permiten visualizar el alcance del protocolo



Elaboración propia.

Figura 8. Posible mecanismo de reacción propuesto para cicloadición azida-enolato (3 + 2)

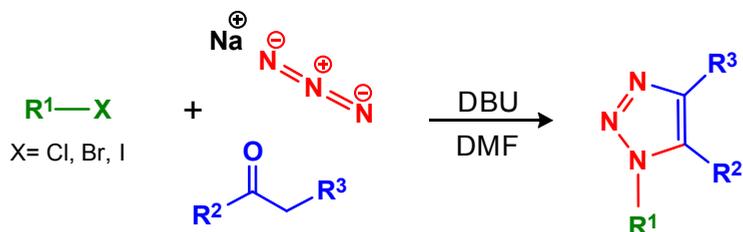


Elaboración propia.

*Obtención de 1, 2, 3-triazoles-1, 4, 5-trisustituídos a partir de halogenuros de alquilo*

Continuando con la búsqueda de nuevas alternativas de síntesis para los 1, 2, 3-triazoles, los autores han reportado (González Calderón et al., 2015) la preparación de 1, 2, 3-triazoles-1, 4, 5-trisustituídos mediante el acoplamiento de tres componentes: un halogenuro de alquilo, azida de sodio y una cetona activa, a través de la cicloadición 1, 3-dipolar azida-enolato (figura 9).

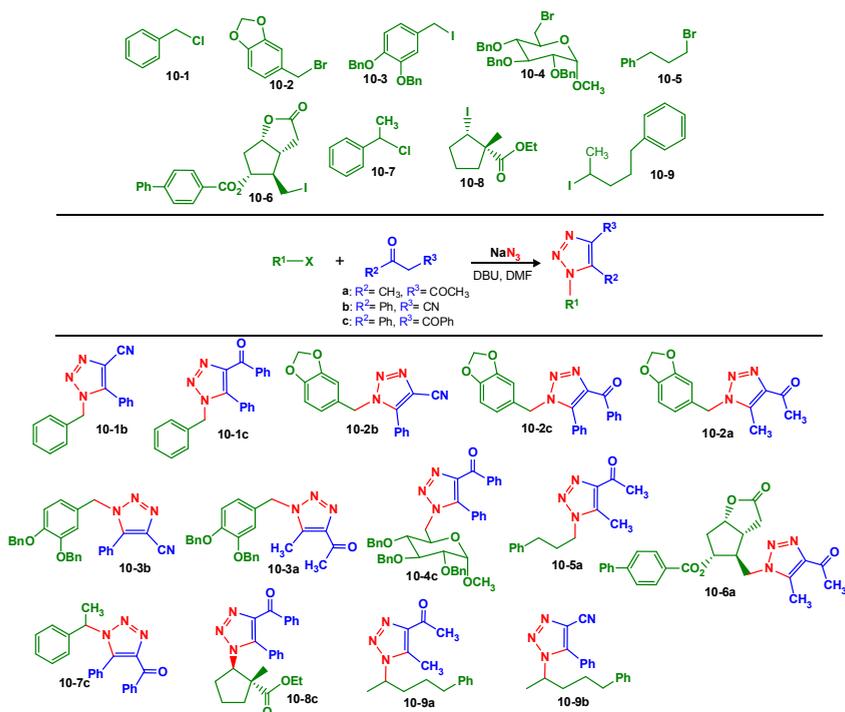
Figura 9. Síntesis de 1, 2, 3-triazoles-1, 4, 5-trisustituídos a partir de halogenuros de alquilo



Elaboración propia.

Esta nueva metodología demostró su eficiencia mediante una amplia variedad de halogenuros de alquilo, incluidos cloruros, bromuros y yoduros, así como derivados primarios y secundarios, como se muestra en la figura 10.

Figura 10. Síntesis de 1, 2, 3-triazoles 1, 4, 5-trisustituídos a partir de halogenuros de alquilo mediante acoplamiento con cetonas activas



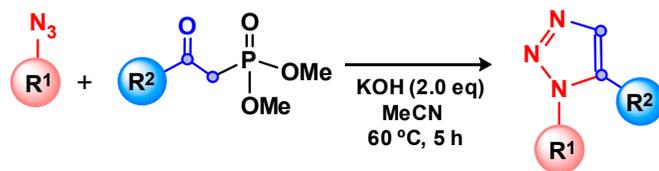
Elaboración propia.

Obtención de 1, 2, 3-triazoles-1, 5-disustituídos a partir de alquil/arilazidas y  $\beta$ -cetofosfonatos

A diferencia de las metodologías anteriores (obtención de triazoles tri-sustituídos), en esta ocasión, los autores desarrollaron una metodología para obtener triazoles disustituídos (posición 1 y 5) (González Calderón et al., 2016) mediante un enfoque simple y eficiente para una síntesis altamente regioselectiva. El acoplamiento a través

de la cicloadición 1, 3-dipolar de aril/alquil azidas y  $\beta$ -cetofosfonatos es promovido por KOH en disolventes grado reactivo (acetonitrilo o tetrahidrofurano) (figura 11).

Figura 11. Síntesis de 1, 2,3-triazoles-1, 5-disustituídos mediante el uso de  $\beta$ -cetofosfonatos

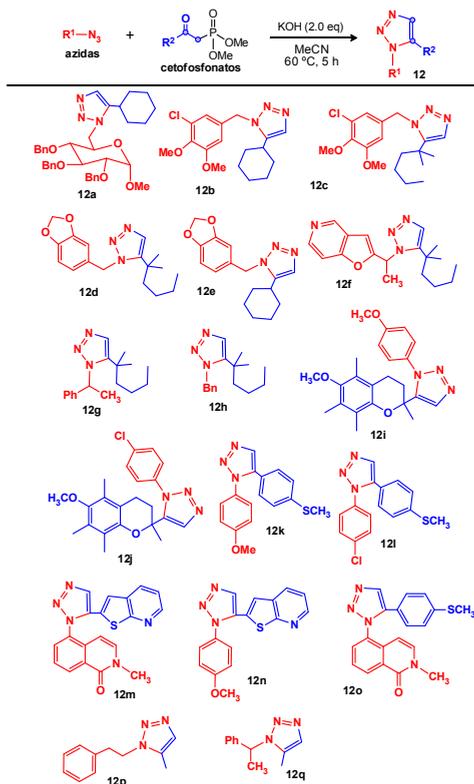


Elaboración propio.

Los alcances de la metodología fueron diversos, los cuales fueron demostrados en azidas alquílicas y arílicas. Así mismo, el uso de sustratos alquílicos como arílicos en los  $\beta$ -cetofosfonatos también fueron evidentes (esquema 12). Se obtuvieron un total de diecisiete compuestos los cuales fueron plenamente identificados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

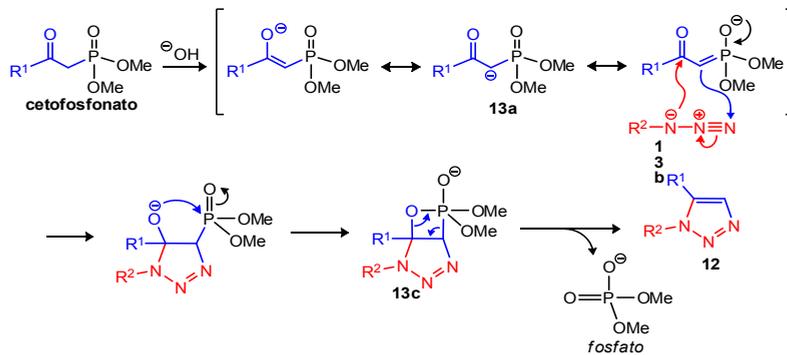
En la figura 13 se muestra un posible mecanismo de reacción. El carbanión fosforilo estabilizado 13a promovido por el grupo hidroxilo permite que el acoplamiento altamente regioselectivo con el grupo azida 13b forme el correspondiente oxafosfetano 13c. La aromatización del anillo produce el producto derivado de fosfato libre, que se separa fácilmente del producto deseado 12 simplemente lavando con agua.

Figura 12. Síntesis de 1, 2, 3-triazoles 1, 4, 5-trisustituídos a partir de aril/alquil azidas y  $\beta$ -cetofosfonatos



Elaboración propia.

Figura 13. Posible mecanismo propuesto para cicloadición azida-enolato (3 + 2)



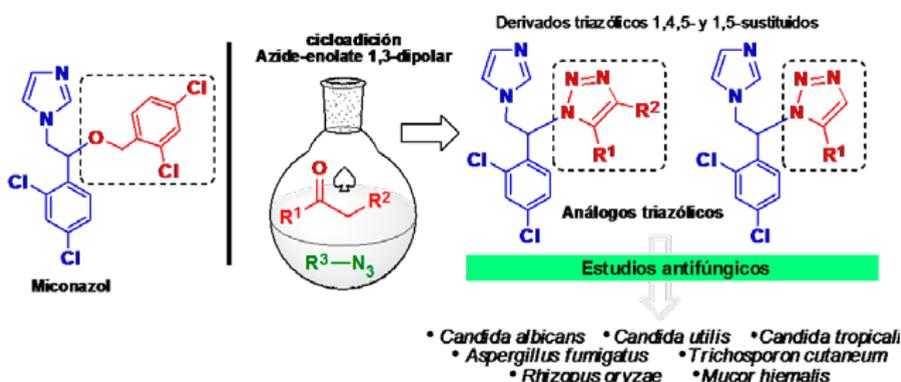
Elaboración propia.

## Desarrollo de nuevas moléculas con actividad antifúngica

### Obtención de análogos del miconazol

En 2016, los autores describieron la obtención de siete análogos de miconazol que implicaron núcleos de triazol 1, 4, 5-tri y 1, 5-disustituido sintetizados mediante cicloadiciones azida-enolato 1, 3-dipolar (figura 14) (González Calderón et al., 2016).

Figura 14. Resumen gráfico que describe la síntesis y evaluación biológica de análogos del miconazol

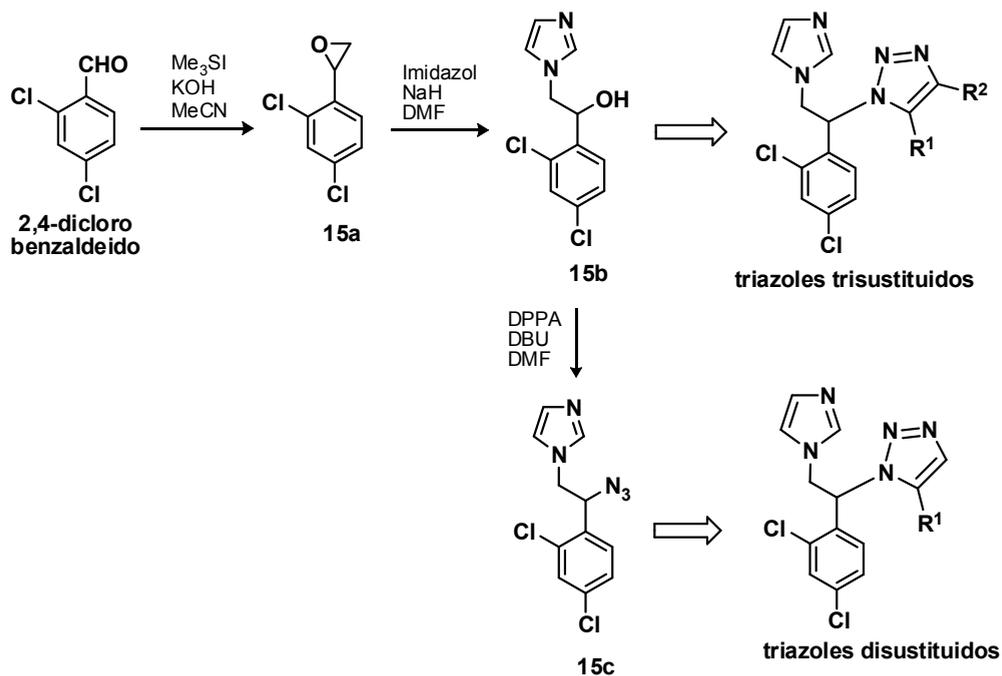


Elaboración propia.

La actividad antifúngica de estos compuestos se evaluó *in vitro* frente a cuatro hongos filamentosos, incluidos *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhizopus oryzae* y *Mucor hiemalis*, así como tres especies de *Candida spp.* como ejemplares de levadura.

El estudio empezó con la síntesis del alcohol 15b (figura 15) como intermediario estratégico, el cual se obtuvo a partir del 2, 4-diclorobenzaldehído (comercialmente disponible) vía una epoxidación Corey-Chavkowsky para obtener así el compuesto 15a el cual sufrió una apertura debido a la introducción del heterociclo imidazol.

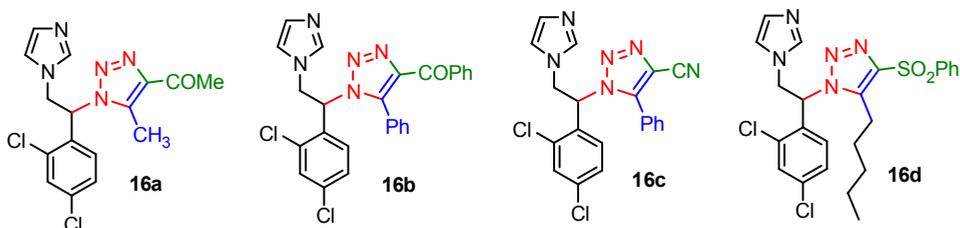
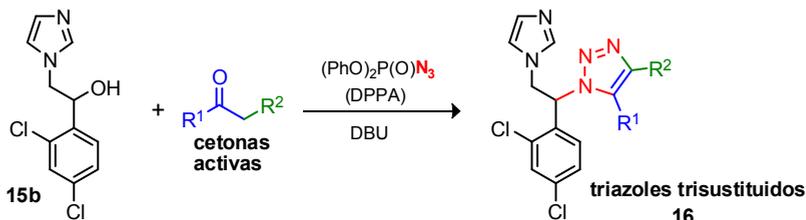
Figura 15. Estrategia sintética para obtener el alcohol (15b) y la azida (15c), plataformas para la obtención de los correspondientes análogos del miconazol



Elaboración propia.

Una vez que se obtuvo el compuesto 15b, este sirvió como plataforma para obtener triazoles trisustituidos análogos del miconazol utilizando la metodología descrita previamente según se discutió en el apartado 2.1 (obtención de 1, 2, 3-triazoles-1, 4, 5-trisustituidos a partir de alcoholes bencílicos). Dicha estrategia sintética permitió el desarrollo de cuatro compuestos análogos del Miconazol según se describe en la figura 16.

Figura 16. Síntesis de triazoles 1, 4, 5-trisustituídos (16) (análogos de miconazol) a partir del alcohol (15b) mediante acoplamiento con cetonas activas



Elaboración propia.

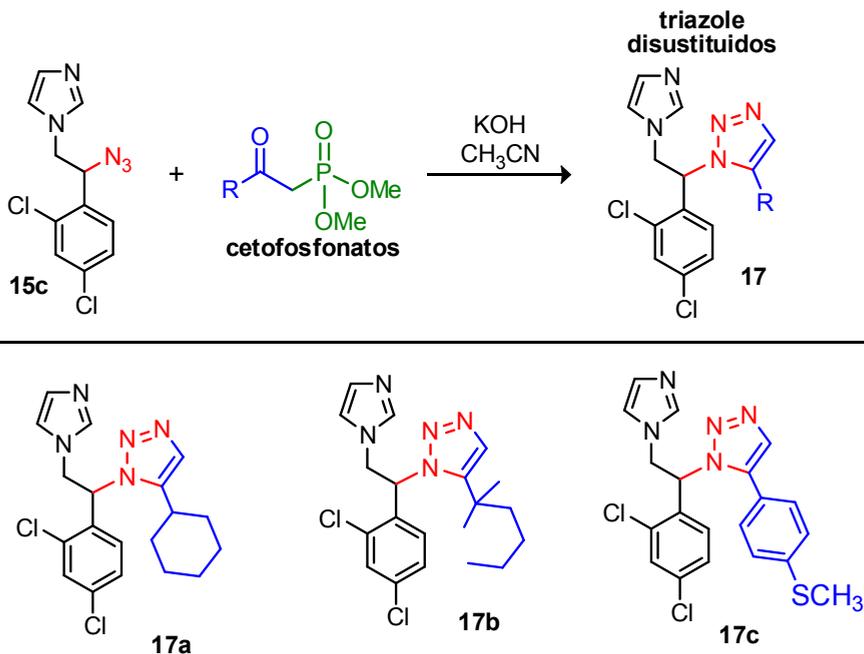
Por otro lado, la subsecuente funcionalización del alcohol 15b, permitió obtener la azida 15c, el cual sirvió como plataforma para llevar a cabo la obtención de triazoles disustituídos análogos del miconazol según la metodología descrita en el apartado 2.3 (obtención de 1, 2, 3-triazoles-1, 5-disustituídos a partir de alquil/arilazidas y  $\beta$ -cetofosfonatos). Dicha estrategia sintética permitió el desarrollo de tres compuestos análogos del miconazol según se describe en la figura 17. Una vez identificados plenamente los análogos del miconazole por métodos espectroscópicos y espectrométricos se procedió a su evaluación antifúngica *in vitro*.

Los compuestos 16a-d y 17a-c se evaluaron para observar una posible actividad antifúngica *in vitro* contra cuatro hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* ATCC-16907, *Trichosporon cutaneum* ATCC-28592, *Rhizopus oryzae* ATCC-10329 y *Mucor hiemalis* ATCC-8690), así como tres especímenes levaduriformes (*Candida utilis* ATCC-9226, *Candida albicans* ATCC-10231 y *Candida tropicalis* ATCC-13803).

Se adoptaron métodos estandarizados de CLSI para llevar a cabo las pruebas microbiológicas. El método de microdilución M38-A2 (National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2002; Barry, 2007; Espinel-Ingroff et al, 2007: 209-241) se utilizó para determinar la susceptibilidad de los hongos

filamentosos; por otro lado, el método M27-A3 CLSI, 2008; Espinel-Ingroff, 2007: 173-208; Fothergill, 2012) se utilizó para la evaluación de las levaduras de *Candida*.

Figura 17. Síntesis de triazoles 1, 5-disustituido (análogos del miconazol) a partir de la azida (15c) mediante su acoplamiento con  $\beta$ -cetofosfonatos



Elaboración propia.

Las actividades antifúngicas de los compuestos evaluados biológicamente se compararon con el itraconazol, un fármaco antifúngico estándar. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos sintetizados así como del fármacos estándar, están expresados en microgramos por mililitro, los cuales se determinaron en placas de 96 pocillos utilizando medio RPMI 1640 tamponado con MOPS (ácido 3- [N-morfolino] propano sulfónico; Aldrich).

La actividad antifúngica de los compuestos evaluados se resume en la tabla 1. Los compuestos 16b, 16d y 17b mostraron buena actividad contra *C. albicans* y *C. tropicalis* (CMI 0.03, 0.06 y 0.03  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente) en comparación con el itraconazol (CMI 0.03  $\mu\text{g/ml}$ ). Dichos compuestos demostraron ser “sensibles”<sup>1</sup> según los parámetros de sensibilidad del documento M27-A3 (tabla 2). Por otro lado,

el resultado antifúngico del compuesto 16d mostró que era mejor o comparable al itraconazol frente a los hongos filamentosos de *T. cutaneum*, *R. oryzae* y *M. hiemalis* (CMI 0.12 frente a 1.0; 0.5 frente a 0.5; y 0.25 frente a 1.0 µg/ml, respectivamente). El compuesto 17b demostró una inhibición moderada del crecimiento de *A. fumigatus* (MIC 0.5 µg/ml) en comparación con el medicamento estándar (MIC 0.25 µg/ml). En contraste con los resultados observados para un sustituyente arilo, estos resultados indican claramente que un grupo alquilo en el triazol 5-sustituido promueve la actividad biológica de este tipo de compuesto. Además, el sustituyente probablemente permita una mejor interacción con la enzima 14- $\alpha$ -desmetilasa (P45014DM, CYP51) (Sheng et al., 2006; Ji et al., 2000), lo que lleva a su inhibición selectiva y, por lo tanto, a la inhibición del crecimiento de la célula fúngica.

Tabla 1. Actividades antifúngicas *in vitro* para los compuestos sintetizados (concentración mínima inhibitoria, µg/ml)

Hongos levaduriformes	Estándar <sup>a</sup>	16a	16b	16c	16d	17a	17b	17c
<i>Candida utilis</i>	0.06	16	16	16	0.25	16	2	16
<i>Candida albicans</i>	0.03	16	0.03	16	0.06	16	0.03	4
<i>Candida tropicalis</i>	0.03	16	0.06	16	0.06	8	0.03	1
Hongos filamentosos								
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.25	16	16	16	2	16	0.5	16
<i>Trichosporon cutaneum</i>	1	16	16	16	0.12	16	8	16
<i>Rhizopus oryzae</i>	0.5	8	8	16	0.5	2	8	16
<i>Mucor hiemalis</i>	1	16	16	16	0.25	0.12	16	16

<sup>a</sup>Itraconazol

Elaboración propia.

<sup>1</sup> “S”, “SDD” y “R” están representados por valores estandarizados (*breakpoints*, valores límite o puntos de corte) utilizados para apreciar el valor clínico del resultado de la prueba antimicótica *in vitro* y predecir la respuesta de los pacientes infectados. La sensibilidad depende de lograr las dosis máximas en plasma (*breakpoints*) para obtener una respuesta óptima. Para itraconazol, una CIM dentro del rango de dosis dependiente de la dosis (SDD) indica la necesidad de concentraciones Plasmáticas de 0.25 a 0.5 mg/ml para una respuesta óptima. Los *breakpoints* para el itraconazol definidos en la literatura se describen en la tabla 2 (Para un mayor entendimiento ver Espinel-Ingroff 2007: 173-208).

**Tabla 2. Determinación de sensibilidad para levaduras (conforme al documento M27-A3): Susceptible (S), sensible dependiente de la dosis (SDD) y resistente (R)**

<i>Compuesto</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
16a	R	R	R
16b	R	S	S
16c	R	R	R
16d	SDD	S	S
17a	R	R	R
17b	R	S	S
17c	R	R	SDD
Estándar <sup>a</sup>	S	S	S

<sup>a</sup> Itraconazol. Criterio de interpretación: Valores límite (MIC, µg/ml) = 0.12 [S], 0.25–0.5 [SDD], 1 [R]

Elaboración propia.

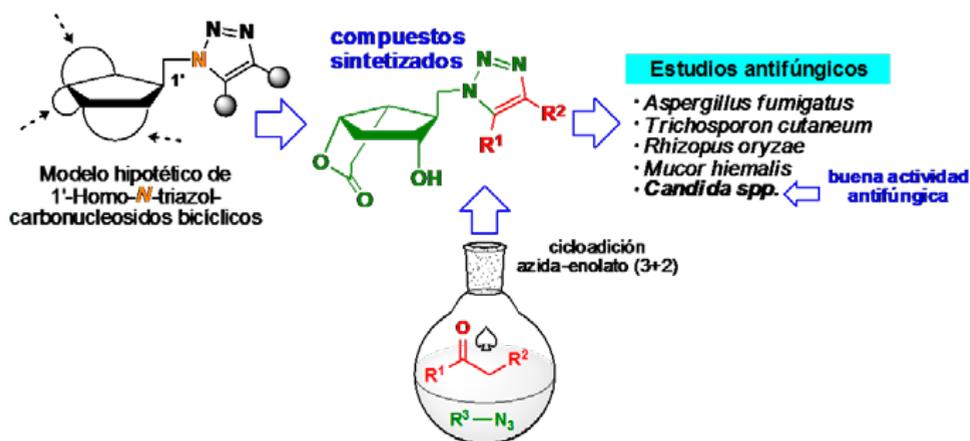
En resumen, la cicloadición 1, 3-dipolar de azida-enolato permitió la síntesis de siete análogos de miconazol con núcleos de triazol 1, 4, 5-tri y 1, 5-disustituido. Los estudios preclínicos mostraron que los compuestos 16b, 16d y 17b tienen un buen alcance contra *C. albicans* y *C. tropicalis*. Se ha demostrado un espectro más amplio de 16d contra hongos filamentosos (*T. cutaneum*, *R. oryzae* y *M. hiemalis*). Debido a la buena/excelente actividad biológica de estos análogos de miconazol demostrada por el contraste con el fármaco de referencia, éstos pueden considerarse como compuestos candidatos para futuros estudios biológicos complementarios.

### Obtención de análogos de nucleósidos

En 2016 (González Calderón et al., 2016) los autores reportaron por primera vez un nuevo tipo de compuestos descritos como carbonucleósidos 1'-homo-*N*-1,2,3-triazol-bicíclicos (figura 18).

La cicloadición de azida-enolato (3 + 2) permitió la síntesis de este nuevo tipo de compuesto. La actividad antifúngica se evaluó *in vitro* frente a cuatro hongos filamentosos así como con nueve especies de *Candida spp.*, especímenes levaduriformes.

Figura 18. Resumen gráfico que describe la síntesis y evaluación biológica de análogos nucleosídicos

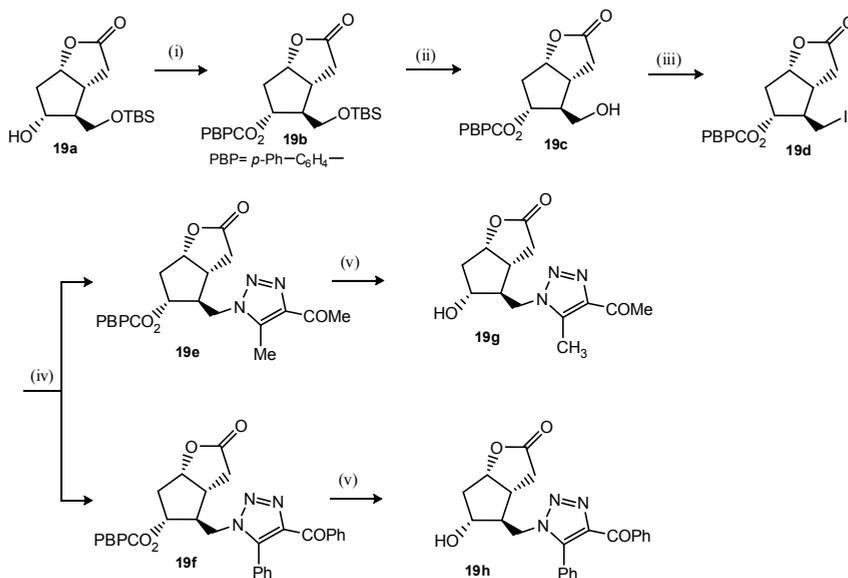


Elaboración propia.

La síntesis involucró el uso de la 'lactona de Corey' 19a (figura 19) como el precursor clave proveedor del anillo de pseudoazúcar (ciclopentano) requerido para la configuración altamente estereoespecífica de todos los grupos funcionales adecuados. Se planificó una estrategia de protección y desprotección conveniente para los alcoholes para la posterior obtención del siguiente intermediario clave 19d (derivado yodado), el cual sirvió como plataforma para la aplicación de la estrategia sintética previamente descrita en el apartado 2.2 (obtención de 1, 2, 3-triazoles-1, 4, 5-trisustituidos a partir de halogenuros de alquilo), esto permitió el desarrollo de dos compuestos análogos nucleosídicos 19g y 19h.

La actividad antifúngica de los compuestos 19g y 19h fueron evaluados *in vitro* contra cuatro hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* ATCC-16907, *Trichosporon cutaneum* ATCC-28592, *Rhizopus oryzae* ATCC-10329 y *Mucor hiemalis* ATCC-8690), así como para *Candida utilis* ATCC-9226, *Candida albicans* ATCC-10231 y *Candida tropicalis* ATCC-13803 como especímenes levaduriformes. Además, otras cepas para *Candida spp.* (*C. lipolytica*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *Candida famata*) se recolectaron de pacientes hospitalizados y se evaluaron bajo los mismos protocolos de estudio.

Figura 19. Ruta sintética para la obtención de los análogos nucleosídicos



(i) PBCl, Py anh., DCM. (ii) AlCl<sub>3</sub>, MeOH, 60 °C. (iii) PPh<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, Imidazol, MeCN anh. 80 °C. (iv) Para el compuesto **19e**: NaN<sub>3</sub>, DMF anh., 60 °C, entonces acetilacetona, DBU, 60 °C. Para el compuesto **19f**: NaN<sub>3</sub>, DMF anh, 60 °C, entonces 2-benzoilacetofenona, DBU, 60 °C. (v) DBN, MeOH.

Elaboración propia.

Los materiales y métodos para la evaluación biológica de los compuestos **19g** y **19h** son los mismos que para aquellos descritos en la sección 3.1, por lo que se omiten para evitar la redundancia.

La actividad antifúngica de los compuestos evaluados se resume en la tabla 3. Los compuestos **19g** y **19h** mostraron buena actividad en algunas de las cepas de levadura, incluyendo *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. glabrata* y *C. famata*, demostrando sensibilidad de acuerdo con Los parámetros del documento M27-A3 (tabla 4). Sólo se observó una ligera actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Mientras que hubo una resistencia evidente por *M. hiemalis*, se encontró una ligera actividad contra el resto de los hongos filamentosos analizados (*A. fumigatus*, *T. cutaneum* y *R. oryzae*).

**Tabla 3. Actividades antifúngicas *in vitro* para los compuestos sintetizados (concentración mínima inhibitoria, µg/ml)**

Hongos levaduriformes	Estándar <sup>a</sup>	Compuesto 19g	Compuesto 19h
<i>Candida albicans</i>	0.03	0.25	2
<i>Candida tropicalis</i>	0.25	0.5	2
<i>Candida utilis</i>	0.25	0.12	0.12
<i>Candida lipolytica</i>	0.03	0.12	0.12
<i>Candida pseudotropicalis</i>	0.12	0.5	1
<i>Candida krusei</i>	0.25	4	4
<i>Candida parapsilosis</i>	0.12	2	4
<i>Candida glabrata</i>	0.06	0.5	0.5
<i>Candida famata</i>	0.06	0.06	0.5
Hongos filamentosos			
<i>Mucor hiemalis</i>	4	>16	>16
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.5	4	8
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	8	>16
<i>Rhizopus oryzae</i>	1	4	8

<sup>a</sup> Itraconazol

Elaboración propia.

**Tabla 4. Determinación de sensibilidad para levaduras (conforme al documento M27-A3): Susceptible (S), sensible dependiente de la dosis (SDD) y resistente (R)**

Hongos levaduriformes	Compuesto 19g	Compuesto 19h	Estándar <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i>	SDD	R	S
<i>Candida tropicalis</i>	SDD	R	SDD
<i>Candida utilis</i>	S	S	SDD
<i>Candida lipolytica</i>	S	S	S
<i>Candida pseudotropicalis</i>	SDD	R	S
<i>Candida krusei</i>	R	R	SDD
<i>Candida parapsilosis</i>	R	R	S
<i>Candida glabrata</i>	SDD	SDD	S
<i>Candida famata</i>	S	SDD	S

<sup>a</sup> Itraconazol. Criterio de interpretación: Valores límite (MIC, µg/ml) = 0.12 [S], 0.25–0.5 [SDD], 1 [R].

Elaboración propia.

Por último, aunque los valores de CMI reportados para los estándares de referencia no fueron consistentes para los estudios reportados en la sección 3.1 y 3.2 debido al uso

de distintos lotes comerciales del itraconazol (95% y 98% de pureza), tales valores se consideran válidos de manera independiente ya que los ensayos se realizaron siempre por triplicado.

En resumen, se han reportado la primera síntesis de un nuevo tipo de compuestos, *1'-homo-N-1, 2, 3-triazol-carbonucleósidos bicíclicos*, representados por 19g y 19h, que mostraron buena actividad contra algunas de las cepas de levadura probadas. Por otra parte, la cicloadición 1, 3-dipolar azida-enolato se empleó como estrategia sintética. Estos reportes hacen que tales estudios sean un gran avance en el campo de la química de los nucleósidos. El estudio preclínico de estos compuestos muestra un buen alcance antimicótico para *Candida spp.* que representa nuevas pistas para un mayor desarrollo del farmacomodulador en esta serie.

## CONCLUSIÓN

En este capítulo se describieron (i) el desarrollo de tres nuevas metodologías de síntesis para la obtención del núcleo del heterociclo *1, 2, 3-triazol* (farmacóforo ampliamente reconocido en la farmacología), y (ii) su aplicación en el desarrollo de los nuevos compuestos antifúngicos (análogos del miconazol y derivados nucleosídicos), sustancias que fueron evaluadas biológicamente por estudios *in vitro* antimicóticos.

Tales metodologías sintéticas (síntesis de triazoles a partir de alcoholes, halogenuros de alquilo y  $\beta$ -cetofosfonatos) se describen como nuevas alternativas para acceder a dichos heterociclos nitrogenados ampliando así la librería de los métodos sintéticos convencionales.

Los estudios biológicos *in vitro* de los análogos del miconazol y nucleosídicos se describen como el primer paso (según protocolos internacionales de desarrollo de fármacos) que sientan las bases, para una continuación a futuro de estudios *in vitro* complementarios (toxicológicos, citotóxicos, genotóxicos, entre otros), así como de estudios *in vivo*. Los compuestos que mostraron actividad biológica prometedora en tales estudios, habrán de considerarse como moléculas líder, sobre los cuales se harán modificaciones estructurales con la intención de optimizar la acción antimicótica.

## REFERENCIAS

- Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S., 2011. Click Chemistry: 1, 2, 3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. Asian J.* 6, 2696–2718.
- Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F., 2009. Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem. Rev.* 109, 4207-4220.
- Andrade, P.; Galo, O. A.; Carvalho, M. R.; Lopes, C. D.; CRNAeiro, Z. A.; Sesti-Costa, R.; Borges de Melo, E.; Silva, J. S. y Carvalho, I., 2015. 1, 2, 3-Triazole-based analogue of benzimidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 6815-6826.
- Barry, A.L., 2007. “An overview of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and its impact on antimicrobial susceptibility tests”, en: Schwalbe, R.; Steele-Moore, L.; Goodwin, A.C. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Florida (USA): CRC Press Taylor y Francis Group. pp. 1-6.
- Benedict, K.; Richardson, M.; Vallabhaneni, S.; Jackson, B. D. y Chiller, T., 2017. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *The Lancet Infect. Dis.* 17 (12), 403-411.
- Bock, V. D.; Hiemstra, H. y Van Maarseveen, J. H., 2006. CuI-catalyzed alkyne-azide “Click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.* 2006 (1), 51-68.
- Brown, N.; Mannhold, R.; Kubinyi, H. y Folkers, G., 2012. *Bioisosteres in Medicinal Chemistry*, Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag.
- Díaz, J. L.; Christmann, U.; Fernandez, A.; Torrens, A.; Port, A.; Pascual, R.; Alvarez, I.; Burgueno, J.; Monroy, X.; Montero, A.; Balada, A.; Vela, J. M. y Almansa, C., 2015. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of selective s1 receptor ligands for the treatment of pain: 4-aminotriazoles. *J. Med. Chem.* 58, 2441-2451.
- Espinel Ingroff, A. y Canton, E., 2007. “Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi”. Schwalbe, R.; Steele-Moore, L.; Goodwin, A. C. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, Florida (USA): CRC Press Taylor y Francis Group, pp. 209-241.
- Espinel-Ingroff, A. y Canton, E., 2007. “Antifungal susceptibility testing of yeasts”. Schwalbe, R.; Steele-Moore, L.; Goodwin, A. C. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Florida (USA): CRC Press Taylor y Francis Group, pp.173-208. ISBN: 9780824741006.

- Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D. y Gurr, S. J., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*. 360 (6390), 739-742.
- Fothergill, A. W., 2012. "Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) methods, Hall, G. S. Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents". How to Detect Resistance. Switzerland: Springer Science-Business.
- González Calderón, D.; Aguirre De Paz, J. G.; González González, C. A.; Fuentes Benítes, A. y González Romero, C., 2015. A straightforward and versatile approach to the synthesis of 1, 4, 5-trisubstituted 1, 2, 3-triazoles from alkyl halides via a one-pot, three-component reaction. *Tetrahedron Lett.* 56 (13), 1713-1715.
- González Calderón, D.; Fuentes Benítes, A.; Díaz Torres, E.; González González, C. A. y González Romero, C., 2016. Azide-Enolate 1, 3-Dipolar Cycloaddition as an Efficient Approach for the Synthesis of 1, 5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from Alkyl/Aryl Azides and  $\beta$ -Ketophosphonates. *Eur. J. Org. Chem.* 2016 (4), 668-672.
- González Calderón, D.; Mejía Dionicio, M. G.; Morales Reza, M. A.; Ramírez Villalva, A.; Morales Rodríguez, M.; Jauregui Rodríguez, B.; Díaz Torres, E.; González Romero, C. y Fuentes Benítes, A., 2016. Azide-enolate 1,3-dipolar cycloaddition in the synthesis of novel triazole-based miconazole analogues as promising antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* 112, 60-65.
- González Calderón, D.; Mejía Dionicio, M. G.; Morales Reza, M. A.; Aguirre de Paz, J. G.; Ramírez Villalva, A.; Morales Rodríguez, M.; Fuentes Benítes, A. y González Romero, C., 2016. Antifungal activity of 1'-homo-N-1, 2, 3-triazol-bicyclic carbonucleosides: A novel type of compound afforded by azide-enolate (3 + 2) cycloaddition. *Bioorganic Chemistry*, 69, 1-6.
- González-Calderón, D.; Santillán-Iniesta, I.; González-González, C. A.; Fuentes-Benítes, A. y González-Romero, C., 2015. A novel and facile synthesis of 1,4,5-trisubstituted 1,2,3-triazoles from benzylic alcohols through a one-pot, three-component system. *Tetrahedron Lett.* 56, 514-516.
- Guimaraes, T. T.; Pinto, M.C.F.R.; Lanza, J. S.; Melo, M. N.; do Monte-Neto, R. L.; de Melo, I. M.; Diogo, E. B.; Ferreira, V. F.; Camara, C. A.; Valença, W. O.; de Oliveira, R. N.; Frezard, F. y Da Silva, E. N., 2013. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and-resistant Leishmania parasites: Synthesis of novel and nor-a-lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azidealkyne cycloaddition, *Eur. J. Med. Chem.* 63, 523-530.

- Haldón, E.; Nicasio, M. C. y Pérez, P. J.; 2015. Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Org. Biomol. Chem.* 13, 9528-9550
- Hein, C. D.; Liu, X. M. y Wang, D., 2008. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res.* 25 (10), 2216-2230.
- Hein, J. E. y Fokin, V. V., 2010. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1302-1315.
- Irfan, M.; Aneja, B.; Yadava, U.; Khan, S. I.; Manzoor, N.; Daniliuc, C. G. y Abid, M., 2015. Synthesis, QSAR and anticandidal evaluation of 1, 2, 3-triazoles derived from naturally bioactive scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.* 93, 246-254.
- Ji, H.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Zhu, J.; Song, Y.; Lü, J. y Zhu, J., 2000. A threedimensional model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J. Med. Chem.* 43, 2493-2505.
- Jiang, Z.; Gu, J.; Wang, C.; Wang, S.; Liu, N.; Jiang, Y.; Dong, G.; Wang, Y.; Liu, Y.; Yao, J.; Miao, Z.; Zhang, W.; Sheng, C. (2014). Design, synthesis and antifungal activity of novel triazole derivatives containing substituted 1, 2, 3-triazole-piperidine side chains. *Eur. J. Med. Chem.* 82, 490-497.
- John, J.; Thomas y J.; Dehaen, W., 2015. Organocatalytic routes toward substituted 1,2,3-triazoles, *Chem. Commun.* 51, 10797-10806.
- Jordão, A. K.; Ferreira, V. F.; Lima, E. S.; De Souza, M. C. B. V.; Carlos, E. C. L. y Castro, H. C.; Geraldo, R. B.; Rodrigues, C. R.; Almeida, M. C. B.; Cunha, A. C., 2009. Synthesis, antiplatelet and in silico evaluations of novel N-substituted-phenylamino-5-methyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazides. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 3713-3719.
- Kim, S.; Cho, S. N.; Oh, T.; Kim, P., 2012. Design and synthesis of 1H-1,2,3-triazoles derived from econazole as antitubercular agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6844-6847.
- Kinfe, H. H.; Belay, Y. H.; Joseph, J. S. y Mukwevho, E., 2013. Evaluation of the influence of thiosemicarbazoneetriazole hybrids on genes implicated in lipid oxidation and accumulation as potential anti-obesity agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 5275-5278.
- Kontoyiannis, D. P., 2017. Antifungal Resistance: An emerging reality and a global challenge. *J. Infect. Dis.* 216 (suppl\_3), S431-S435.
- Kumar, K.; Pradines, B.; Madamet, M.; Amalvict, R.; Benoit, N. y Kumar, V., 2014. 1H-1, 2, 3-triazole tethered isatin-ferrocene conjugates: synthesis and in vitro antimalarial evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 87, 801-804.

- Lima, C. G. S.; Ali, A.; van Berkel, S. S.; Westermann, B. y Paixão, M. W., 2015. Emerging approaches for the synthesis of triazoles: beyond metal-catalyzed and strain-promoted azidealkyne cycloaddition. *Chem. Commun.* 51, 10784-10796.
- Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Del Grosso, E.; Grosa, G.; Sorba, G. y Tron, G. C., 2014. Are 1,4 and 1,5-disubstituted 1, 2, 3-triazoles good pharmacophoric groups?. *Chem. Med. Chem.* 9, 2497-2508.
- Meldal, M.; Tornøe C. W., 2008. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, *Chem. Rev.* 108, 2952-3015.
- Moreira-Lima, L. y Barreiro, E. J., 2005. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Curr. Med. Chem.* 12 (1), 23-49.
- National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard. 3th edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002. Document M38-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard. 2° edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Patani, G. A. y LaVoie, E. J., 1996. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* 96 (8), 3147-3176.
- Pericherla, K.; Khedar, P.; Khungar, B. y Kumar, A., 2012. Click chemistry inspired structural modification ofazole antifungal agents to synthesize novel 'drug like' molecules. *Tetrahedron Lett.* 53, 6761-6764.
- Perlin, D. S.; Rautemaa Richardson, R. y Alastruey Izquierdo, A., 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infect. Dis.* 17 (12), 383-392.
- Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A. y Berkland, C. J., 2018. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* 29 (3), 686-701.
- Ramasastri, S. S. V., 2014. Enamine/Enolate-mediated organocatalytic azide-carbonyl [3-2] cycloaddition reactions for the synthesis of densely functionalized 1,2,3-triazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 14310-14312.
- Reddy, R.V.; Reddy, P. V.; Mishra, N. N.; Shukla, P. K.; Yadav, G.; Srivastava, R. y Shaw, A. K., 2010. Synthesis and biological evaluation of glycal-derived novel tetrahydrofuran 1,2,3-triazoles by 'click' chemistry. *Carbohydr. Res.* 345, 1515-1521.

- Shafi, S.; Alam, M. M.; Mulakayala, N.; Mulakayala, C.; Vanaja, G.; Kalle, A. M.; Pallu, R. y Alam, M. S., 2012. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: their anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Eur. J. Med. Chem.* 49, 324-333.
- Sheng, C.; Zhang, W.; Ji, H.; Zhang, M.; Song, Y.; Xu, H.; Zhu, J.; Miao, Z.; Jiang, Q.; Yao, J.; Zhou, Y.; Zhu, J. y Lü, J., 2006. Structure-based optimization of azole antifungal agents by CoMFA, CoMSIA, and molecular docking. *J. Med. Chem.* 49, 2512-2525.
- Singh, M. S.; Chowdhury, S. y Koley, S., 2016. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron.* 72, 5257-5283
- Thirumurugan, P.; Matosiuk, D. y Jozwiak, K., 2013. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications. *Chem.* 113, 4905-4979.
- Totobenazara, J. y Burke, A. J., 2015. New click-chemistry methods for 1,2,3-triazoles synthesis: recent advances and applications. *Tetrahedron Lett.* 56, 2853-2859.
- Vallabhaneni, S; Mody, R. K.; Walker, T. y Chiller, T., 2015. The global burden of fungal diseases. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 30, 1-11.
- Vernekar, S. K. V.; Qiu, L.; Zacharias, J.; Geraghty, R. J. y Wang, Z., 2014. Synthesis and antiviral evaluation of 40-(1,2,3-triazol-1-yl)thymidines. *Med. Chem. Commun.* 5, 603-608.
- Vernekar, S. K. V.; Qiu, L.; Zhang, J.; Kankanala, J.; Li, H.; Geraghty, R. J. y Wang, Z., 2015. 50-Silylated 30-1,2,3-triazolyl thymidine analogues as inhibitors of West Nile virus and dengue virus. *J. Med. Chem.* 58, 4016-4028.
- Wiederhold, N. P., 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect. Drug Resist.* 10, 249-259.
- Wu, P. y Fokin, V. V., 2007. Catalytic azide-alkyne cycloaddition: Reactivity and applications. *Aldrichimica Acta*, 40 (1), 7-17.
- Yao, H.; Liu, J.; Xu S.; Zhu Z. y Xu J. (2017). The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 12 (2), 121-140.
- Yempala, T.; Sridevi, J. P.; Yogeewari, P.; Sriram, D. y Kantevari, S., 2014. Rational design and synthesis of novel dibenzo[b,d]furan-1,2,3-triazole conjugates as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* 71, 160-167.
- Zhou, C. H. y Wang, Y., 2012. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.* 19, 239-280.

RETOS ACTUALES DE LA FARMACIA.  
de Leobardo Manuel Gómez Oliván,  
Mariana Ortíz Reynoso, Hariz Islas Flores,  
Jonnathan Guadalupe Santillan Benitez y  
Enrique Morales Ávila (Coordinadores), se  
terminó de editar en noviembre de 2019. El  
cuidado de la edición estuvo a cargo de la  
Dirección de Publicaciones Universitarias  
de la UAEM.

Editor responsable:  
JORGE E. ROBLES ALVAREZ

## RETOS ACTUALES DE LA FARMACIA

*Retos actuales de la farmacia* es un proyecto que está coordinado por Leobardo Manuel Gómez Oliván y un equipo de investigadores que forman parte del claustro de la Facultad de Química en el área de posgrado, ellos han incentivado el espíritu investigador y científico de los estudiantes adscritos al programa para adentrarse en el ámbito farmacéutico.

Los capítulos que conforman esta edición son el reflejo de la actividad académica desarrollada en este posgrado en las diferentes áreas de acentuación que lo conforman: farmacia molecular, farmacia social y tecnología farmacéutica.

**SDC**

AUTONOMÍA  
**UAEM**  
**75°**  
ANIVERSARIO