



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Estudio de la melatonina como agente preventivo del daño gastrointestinal inducido por antiinflamatorios no esteroideos

Aroha Belén Sánchez Milán

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Unitat de Biofarmàcia i Farmacocinètica.
Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica.

**ESTUDIO DE LA MELATONINA COMO AGENTE PREVENTIVO DEL DAÑO
GASTROINTESTINAL INDUCIDO POR ANTIINFLAMATORIOS NO
ESTEROIDEOS**

**AROHA BELÉN SÁNCHEZ MILÁN
2020**



FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS**

**ESTUDIO DE LA MELATONINA COMO AGENTE PREVENTIVO DEL DAÑO
GASTROINTESTINAL INDUCIDO POR ANTIINFLAMATORIOS NO
ESTEROIDEOS**

Memoria presentada por Aroha Belén Sánchez Milán para optar al título de doctor por la universidad de Barcelona.

Directoras de Tesis:

Ana C. Calpena Campmany

Beatriz Clares Naveros

Tutora de Tesis:

Ana C. Calpena Campmany

Doctoranda:

Aroha Belén Sánchez Milán

**AROHA BELÉN SÁNCHEZ MILÁN
2020**

A Martín y Gonzalo, que antes de nacer, me dieron la determinación necesaria para acabar este reto. A mi marido Aitor por dar alas a todos los proyectos que decido emprender.

“Cuando sentimos miedo ante lo desconocido, el peligro o la simple incertidumbre, la primera de las estrategias que podríamos emplear, sería la de no enfocarnos en lo que podemos perder, sino en lo que podemos llegar a ganar” Mario Alonso Puig

AGRADECIMIENTOS

Cuesta creer que después de seis años acompañándome haya llegado el momento de poner fin a este reto que ha supuesto mi tesis doctoral y la frase “no puedo porque estoy con la tesis” ya no vaya a ser parte de mis días y ratos libres. Esta tesis me ha acompañado en la etapa más trascendental de mi vida el comienzo de mi etapa laboral, mi boda y en mi reciente maternidad. Parece que fue ayer cuando me crucé con la Dra. Beatriz en aquella escalera de la Facultad de Farmacia de Granada, hacía ya un par de años que nos habíamos conocido en unas prácticas de biofarmacia donde esa profesora que explicaba tan bien, nos habló sobre la industria farmacéutica en Barcelona con una pasión que se contagiaba; aquel día en la escalera, después de un par de años sin vernos, yo le daba vueltas a mi futuro, había terminado la carrera y sabía que quería apostar por la industria pero no tenía ni idea de por donde empezar, ella sin saberlo marcó mi destino para siempre y en aquella escalera me habló sobre un Máster de industria en la UB y las opciones que tendría si iba a Barcelona. Solo puedo estar agradecida porque ese encuentro me abrió las puertas a una profesión que me apasiona, que me ha dado y me da tanto y trajo a mi vida a personas que nunca pensé que podría encontrar, la primera de esas personas fue la Dra. Ana; a Ana la conocí un 2 de octubre de 2013, ella me acogió en todos los sentidos en los que se puede acoger a una persona, no solo ha dirigido mi tesis, en Barcelona se convirtió en un pilar fundamental para mí; no he conocido a nadie como ella, con su fuerza y convicción, su forma de resolver todos los problemas y su entrega. Gracias, Bea y Ana, sois y seréis un referente para mí, estar bajo vuestra dirección ha sido un regalo, sin vosotras no lo hubiera conseguido.

Gracias a la Dra. Maria Luisa, siempre recordaré con cariño el año de Máster y las tardes en su despacho.

A la Dra. María José Rodríguez Laguna y María José Fábrega, por cederme parte de vuestro tiempo, sin vosotras y vuestra desinteresada ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

Gracias a Álvaro Gimeno y Lidia Gómez, por la ayuda y las tardes de estabulario y quirófano. Gracias a mis compañeros de departamento por las tardes y noches de laboratorio, Berenice, María, Marcelle, Mireia, Alexander y Nora.

Gracias a mi Cristina Moles, Cris, que llegó a Barcelona un año más tarde que yo también de parte de Bea, convirtiéndose en otro de mis pilares, espero y deseo que el destino nos haga coincidir en la misma ciudad de nuevo. Y gracias a la “familia catalana” Sonia, Lucía y Sohaib que ya está más cerca que nunca de ese reencuentro.

Gracias Anabel y Javier, que cada día en el trabajo me escuchabais aquello de “esta tarde a la facultad con la tesis” o “ayer estuve hasta las tantas con la tesis y he dormido solo 7 horas”, gracias por animarme y creer en mí. Y a Cris, por tener siempre palabras de admiración, ya sabes que es mutuo.

Gracias a todas mis amigas de Farmacia, Ville, Coro, Ana G., Ana L, Puri, María, Cristina, Elena, Amaya, Marina, Maritere, Nere, Celia, Rosa y Cova, todas grandes

farmacéuticas y que se ha convertido en el grupo de hermanas más grande que pueda existir. No me olvido de mis chicos farmacéuticos, Luis, Alberto O. y Alberto D. por los buenos momentos, por apoyarnos, aconsejarnos y compartir cada uno de nuestros logros.

A mis padres, Belén y Germán, gracias por haberme dado la oportunidad de estudiar Farmacia sin preocupaciones, por insistir siempre en que pusiera toda mi energía solo en estudiar, en formarme y dedicarme a lo que me hiciera feliz que de lo demás se encargaban ellos. Por reglarme un futuro que ahora es un presente que adoro.

Y, por último, a ti Aitor, mi marido, compañero y mi todo. Gracias, porque no he tenido que renunciar a nada y al mismo tiempo que luchaba y me esforzaba por acabar esta tesis doctoral que era un sueño para mí, hemos construido nuestra familia, nos hemos casado, hemos disfrutado del tiempo juntos, nos hemos apoyado y lo más importante hemos creído el uno en el otro, en alcanzar nuestras propias metas y seguir creciendo en todos los sentidos. A Martín y Gonzalo, nuestros mellizos, a los que antes de conocer, me dieron la determinación necesaria para acabar este reto. Sois el mayor de los regalos que el destino me tenía preparado, no puedo sentirme más agradecida y afortunada.

ÍNDICE

ÍNDICE	i.
ABREVIATURAS	v.
I. INTRODUCCIÓN	22
1. ADMINITRACIÓN ORAL	23
1.1. El aparato digestivo. Anatomía, fisiología y funciones	23
1.1.1. Capas del tracto gastrointestinal	24
1.1.2. Epitelio del tracto gastrointestinal	27
1.1.3. Elementos de defensa de la mucosa gástrica.	32
1.2. Biodisponibilidad oral y absorción intestinal.	34
1.2.1. Farmacocinética: Generalidades.	35
1.2.2. Solubilidad.	40
1.2.3. Liberación: Disolución	43
1.2.4. Permeabilidad: Coeficiente de permeabilidad efectiva (Peff), Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp), fracción de fármaco absorbido (F_a) y constante de absorción (K_a).	46
1.2.5. Factores secundarios que influyen en la absorción oral de medicamentos.	51
1.2.5.1. Factores biológicos del tracto gastrointestinal.	51
1.2.5.2. Factores relacionados con la forma farmacéutica.	54
1.3. Clasificación Biofarmacéutica de fármacos (BCS)	54
1.3.1. Estudios de permeación intestinal	56
1.3.1.1. Métodos in vivo	57
1.3.1.1.1. Estudio farmacocinético de balance masas en humanos	57
1.3.1.1.2. Estudio de bioequivalencia absoluta en humanos	58
1.3.1.1.3. Estudio de perfusión intestinal en humanos	58
1.3.1.1.4. Estudios de perfusión intestinal con modelos animales in vivo e in situ	59
1.3.1.2. Métodos in vitro	60

1.3.1.2.1.	<i>Membranas artificiales.</i>	60
1.3.1.2.2.	<i>Modelos celulares: Caco-2</i>	60
2.	INFLAMACIÓN	63
2.1.	Causas y síntomas	63
2.2.	Estrés oxidativo en inflamación	68
3.	ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	72
3.1.	Introducción.	72
3.2.	Datos de mercado y uso a nivel global.	73
3.3.	Mecanismo de acción de los Antiinflamatorios no esteroideos, daño gastrointestinal y su impacto económico.	77
3.1.	Inhibidores de la bomba de protones: tratamiento clásico y efectos secundarios.	82
4.	MELATONINA	84
4.1.	Generalidades	84
4.2.	Funciones fisiológicas y mecanismo de acción	85
4.3.	Papel de la melatonina en el estrés oxidativo y la inflamación (<i>Artículo 1 Revisión</i>)	86
	CAPÍTULO II OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	115
	CAPÍTULO III RESULTADOS	120
5.	Artículo 2	122
6.	Artículo 3	139
	CAPÍTULO IV DISCUSIÓN	161
	CAPÍTULO V CONCLUSIONES	171
	CAPÍTULO VI REFERENCIAS	175
	OTROS MÉRITOS	197
7.	Artículo 4 (Revisión bibliográfica)	199
8.	Artículo 5 (Artículo de opinión)	219

ABREVIATURAS

Abreviaturas

AA: Ácido araquidónico

AAS: Ácido acetil salicílico

ACC: Acil -CoA carboxilasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AMP: Adenosín monofosfato

AR: Anfirregulina

ATP: Adenosín trifosfato

BCRP: “Breast cancer resistant protein” proteína de resistencia de cáncer de mama

BTC: Betacelulina

Caco-2: Human Colon Carcinoma Cell Line

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

CTE: Cadena de transporte de electrones

COX: Ciclooxygenasa

DAG: Diacilglicerol

DHOH: Dihidroorotato deshidrogenasa

DIC: Diclofenaco

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

EETs: Ácidos epoxieicosatrienoicos

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos

FGFR: Receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos

FUR: Furosemida

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GI: Gastrointestinal

GIP: Péptido insulínico dependiente de glucosa

HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferasa

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

HO-1: *eme* oxigenasa 1

HT: Hidroxitriptamina

HTZ: Hidroclorotiazida
IB: Ibuprofeno
IBP: Inhibidores de la bomba de protones
IL: Interleucina
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃: Inositol trifosfato
ITF: Factor de trébol intestinal
KT: Ketorolaco trometamina
LPS: Lipopolisacárido
K_a: Constante de absorción (a minúscula)
K_A: Constante de disociación ácida (A mayúscula)
K_b: Constante de disociación básica
KET: Ketoprofeno
KGDHC: Complejo deshidrogenasa α -cetoglutarato
LOX: Lipooxigenasas
LPS: Lipopolisacárido
MAO: Monoamino oxidasa
MCT1: Transportador apical de sodio y bilis
MDA: Malondialdehído
MLT: Melatonina
MRP2: Proteína asociada a resistencia a multi fármacos 2
NADH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NAT: Serotonina-N-acetil transferasa
NO: Óxido nítrico
NF- κ B: Factor nuclear kappa-B
OGDC: Complejo de oxoglutarato deshidrogenasa
OATP(2B1): Polipéptido orgánico transportador de aniones
P38MAPK: Proteínas quinasas p38 activadas por mitógenos
PAF: Factor activador de plaquetas
PAF-LL: Fosfatidilcolina oxidada
PAFR: Receptor del factor activador de plaquetas
P_{app}: Permeabilidad aparente
PBS: Tampón fosfato salino

PepT1: Transportador de péptidos
PGDH: Piruvato deshidrogenasa
PIP₂: Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKC: Proteína Kinasa C
PC: Fosfatidilcolina
PL: Fosfolípido
PLA₂: Fosfolipasa A₂
PLC: Fosfolipasa C
Peff: Permeabilidad efectiva
PCT: Paracetamol
PG: Prostaglandina
PGD₂: Prostaglandina D₂
PGE₂: Prostaglandina E₂
PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}
PGG₂: Prostaglandina G₂
PGH₂: Prostaglandina H₂
PGI₂: Prostaciclina
P-gp: Glicoproteína P
PSP: Polipéptido espasmolítico pancreático
RL: Radical libre
ROR1: receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (tyrosine kinase-like orphan receptor 1)
ROR2: receptor huérfano tipo tirosina quinasa 2 (tyrosine kinase-like orphan receptor 2)
ROS: Especies reactivas de oxígeno o radicales libres de oxígeno
RNI: Especies reactivas de nitrógeno
SOD: Superóxido Dismutasa
SDH: Succinato deshidrogenasa
TFF: Factor trébol o trefoil
TGF: Factor transformador del crecimiento
TLR-4: Receptor tipo toll 4
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
TX: Tromboxano
TXA₂: Tromboxano A₂
UV: Ultravioleta
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VSMCs: Células vasculares del músculo liso

XO: Xantina oxidasa

I. INTRODUCCIÓN

1. ADMINISTRACIÓN ORAL

1.1. El aparato digestivo. Anatomía, fisiología y funciones.

El aparato digestivo está compuesto por el tracto gastrointestinal (GI) y por los órganos accesorios que son hígado, páncreas, mesenterio y vesícula biliar (Kararli, 1995) (Figura 1). El tracto GI va desde la boca, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleo), intestino grueso (colon, ciego y recto) hasta el ano. La longitud total del tracto GI es de unos 5 metros en una persona viva, longitud que se duplica hasta los 10 metros de largo cuando se produce la pérdida de tono muscular en un cadáver (Leung, 2014). La luz o lumen GI se caracteriza por ser un espacio, que está bordeado por células epiteliales polarizadas, recubierta con una capa de moco en personas sanas (Gelberg, 2014).

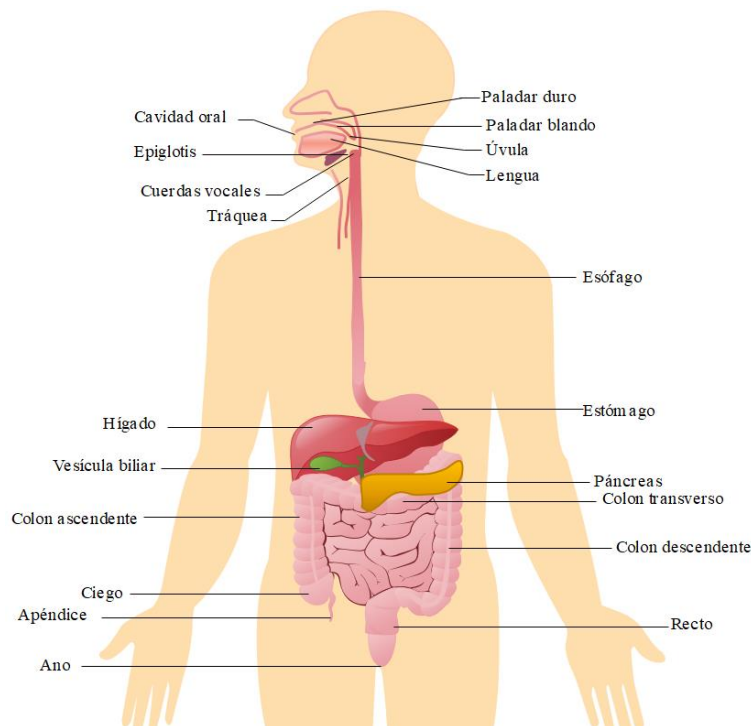


Figura 1. Estructura del aparato digestivo. Editado con Edraw™ Max 9.4.

El ligamento de Treitz que une el duodeno y el yeyuno marca la división entre el tracto GI superior e inferior. Este ligamento conecta la flexión duodeno yeyunal al tejido conectivo que rodea a la arteria mesentérica superior y la arteria celíaca (Kim y cols. 2008).

El tracto GI está diseñado para realizar una variedad de funciones fisiológicas que incluyen el procesamiento de alimentos para la obtención de energía, absorción de

nutrientes, defensa, secreción de agua y una enorme cantidad de biomoléculas y otros procesos corporales. Estas funciones fisiológicas se llevan a cabo a través de cuatro procesos fisiológicos principales: Digestión, secreción, absorción y motilidad. (Leung, 2014). Para ello el tracto GI está organizado en distintas regiones, capas y tejidos con peculiaridades estructurales y funcionales. Los tejidos en las distintas regiones están compuestos de diferentes células, que permite el desempeño de los diversos roles y funciones fisiológicas.

Los distintos segmentos del tracto GI pueden contraerse y relajarse con diferente tiempo de tránsito dependiendo de su propia función específica (por ejemplo, motilidad o secreción). El motor y las actividades secretoras del sistema GI están controladas e integradas por el sistema nervioso endocrino y entérico del intestino (Leung, 2014).

La figura 2 representa de forma esquemática las distintas capas y tejidos del tracto GI.

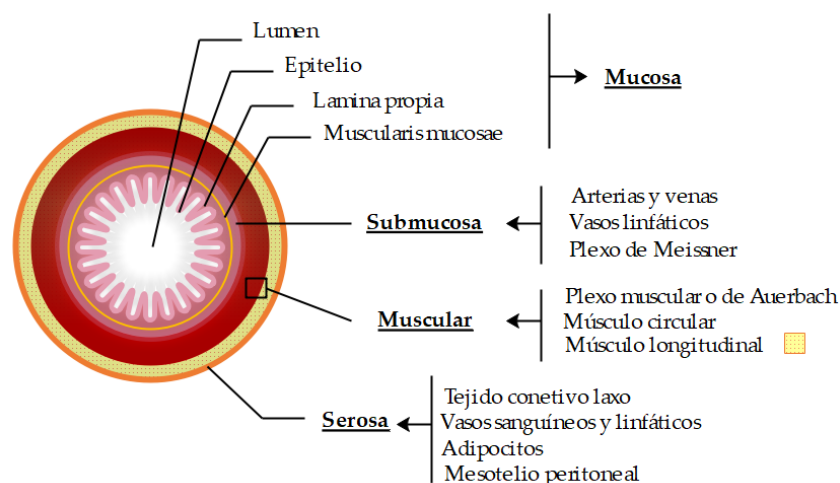


Figura 2. Capas del tracto gastrointestinal. Editado con Edraw™ Max 9.4.

1.1.1. Capas del tracto gastrointestinal

Túnica mucosa

Se trata de la capa más proximal a la luz intestinal. Contiene una capa gruesa de moco que recubre las células epiteliales y una capa subyacente llamada lámina propia. Una de las características de las células epiteliales GI es que tienen diferentes enlaces intercelulares que permiten el intercambio de moléculas unas con otras. La lámina propia es una capa delgada de tejido conectivo areolar compuesto de células y una matriz extracelular compuesta por agua, glicosaminoglicanos, como hialuronato

(principalmente), heparina, sulfato de heparina, glicoproteínas, proteoglicanos, fibras de colágeno y elastina; junto a numerosos nódulos linfáticos, vasos sanguíneos capilares, glándulas mucosas y terminaciones nerviosas sensoriales. La lámina propia forma el núcleo del tejido conectivo. En la mayoría de las áreas del tracto GI, la lámina propia también contiene células musculares lisas que forman una capa de tejido llamada *muscularis mucosae*. Esta capa muscular produce movimientos locales de la mucosa, pero no es la responsable del movimiento de la comida o el contenido GI a través del tracto. (Welcome, 2018).

Túnica submucosa

La túnica submucosa es una capa relativamente gruesa y altamente vascularizada de tejido conectivo que sirve a las estructuras mucosas y submucosas. La submucosa es un tejido conectivo más denso que la lámina propia de la mucosa. Las moléculas absorbidas que pasan a través de las células epiteliales columnares de la mucosa entran en sangre y en los vasos linfáticos de la submucosa. La submucosa también contiene glándulas y plexo nervioso (Plexo submucoso o de Meissner llamado así por el científico alemán, Georg Meissner, 1829-1905), que no solo inervan las glándulas submucosas y mucosas si no, que también proporcionan suministro nervioso a la mucosa muscularis del intestino delgado y grueso. Las glándulas GI ubicadas en la submucosa, pasan a través de las subcapas y se abren en la luz a través de conductos. Las arterias y venas de la capa submucosa se extienden desde el mesenterio. Esta capa también contiene vasos linfáticos (Welcome, 2018).

Túnica muscularis

La túnica muscular comprende dos capas de músculo, las capas interna y externa de células del músculo liso. La capa interna está dispuesta en anillos circulares alrededor del tracto GI, y se denomina capa muscular circular. La capa exterior está dispuesta longitudinalmente, y se denomina capa muscular longitudinal. El estómago tiene una capa muscular adicional, capa muscular oblicua, ubicada en su lado interno que participa en el batido de los alimentos parcialmente digeridos. Las capas musculares se denominan *tunica muscularis externa* (capa muscular externa; también llamada *muscularis propria*). Son músculos lisos orientados del tracto GI, responsables de las contracciones

segmentales y los movimientos peristálticos necesarios para la descomposición mecánica de partículas de alimentos, mezclándolos con enzimas digestivas y su propulsión a lo largo del tracto. Esta función motora (motilidad o contractilidad) está regulada por las neuronas de las divisiones simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo entre otros. En el colon, la capa longitudinal externa forma tres bandas longitudinales discontinuas conocidas como *taeniae coli* (que significa "bandas del colon". *Taenia*, *taeniae* plural, palabra en latín que significa cinta o banda). Las *taeniae coli* son características y clave para distinguir entre el intestino grueso y el delgado. Otra característica morfológica del colon es la presencia de *haustra* (singular *haustum*). El *Haustra* se forma porque las bandas *taeniae coli* son más cortas que la longitud del colon, dando lugar a la formación de un saco entre cada una de las bandas. La contracción del *haustra* es un segmento lento que ocurre periódicamente y es importante para el movimiento del contenido intraluminal al recto para su eliminación. Esta segmentación del colon facilita la mezcla, la retención de residuos en la luz intestinal y la formación de heces sólidas. La función reservorio del colon se debe particularmente a la presencia de *haustra* que tiene como propiedad una alta capacidad de distensión. (Camilleri y Ford, 1998). En ciertas zonas de unión del tubo digestivo parte de las capas musculares circulares y longitudinales se engrosan, formando esfínteres, los cuales regulan el paso de sólidos y fluidos de una región a otra del tracto GI. (Welcome, 2018).

Túnica serosa/Adventitia

La *túnica serosa* (también llamada capa serosa) es la capa externa del tracto GI, formada por el mesotelio que es epitelio escamoso simple y por tejido conectivo. La capa serosa ayuda a mantener el tracto GI y sus estructuras. El mesotelio reduce las fuerzas de fricción durante el movimiento de las paredes del tracto GI. El epitelio escamoso simple se duplica como una continuación del peritoneo visceral. La capa serosa está presente en algunas regiones (u órganos) del sistema GI y sobresale en la cavidad peritoneal. Dichos órganos o regiones del tracto GI son referidos como intraperitoneales. Por lo tanto, los órganos intraperitoneales (suspendidos por el peritoneo) están cubiertos por serosa. Las regiones intraperitoneales del tracto GI incluyen la mayor parte del estómago, todo el intestino delgado (excepto la parte distal del duodeno). La porción inicial del duodeno, ciego, apéndice, transversal colon y colon sigmoide son intraperitoneales y están conectados al mesenterio. En otros órganos o regiones del tracto GI como el páncreas, la

cavidad oral, esófago, píloro del estómago, duodeno distal, colon ascendente, descendente colon, recto y canal anal solo está presente la porción de tejido conectivo de la serosa (llamada adventicia) y se denominan retroperitoneales (Welcome, 2018).

1.1.2. Epitelio del tracto gastrointestinal

El epitelio que cubre todo el tracto GI comprende una red estructural y funcional de células interrelacionadas entre sí, según la región es estratificado o columnar simple (Nikitina y cols., 2016) y constituye la superficie mucosa continua más grande del cuerpo humano. El epitelio de la boca, la faringe, el esófago y el conducto anal es principalmente plano estratificado no queratinizado con función protectora. El estómago y los intestinos están revestidos por un epitelio cilíndrico simple, con funciones de secreción y absorción. Las uniones estrechas (*zonula occludens*), que sellan firmemente las células adyacentes del epitelio cilíndrico simple, impiden que haya filtraciones entre esas células (Tortora y Derrickson, 2017).

La capa epitelial de la mucosa del intestino delgado consiste en epitelio cilíndrico simple formado por distintos tipos de células altamente especializadas que se dedican a la regeneración epitelial, adquisición de nutrientes, defensa innata, transporte de inmunoglobulinas e inmunología. La figura 3 muestra un esquema de la mucosa GI y de las distintas células del epitelio intestinal. Las células absorptivas del epitelio o enterocitos contienen enzimas que digieren los alimentos y microvellosidades que absorben nutrientes del quimo intestinal. En este epitelio, se hallan también las células caliciformes que secretan moco. La mucosa del intestino delgado contiene muchos surcos profundos o invaginaciones revestidas por epitelio glandular y proyecciones en forma de dedos llamados vellosidades. Las células que revisten los surcos forman las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn y secretan jugo intestinal. (Tortora y Derrickson, 2017).

Además de las vellosidades intestinales, la superficie de la luz intestinal contiene pliegues circulares y microvellosidades, que aumentan colectivamente el área superficial de 400 a 600 veces (Welcome, 2018). Además, están las células Paneth, que liberan factores antimicrobianos como lisozima, una enzima bactericida y pueden realizar fagocitosis. Estas células tendrían un papel fundamental en la regulación de la población microbiana del intestino delgado. En las glándulas intestinales se hallan tres tipos de células

enteroendocrinas: células S, CCK y células K, que secretan las hormonas, secretina, colecistocinina y péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) respectivamente. (Tortora y Derrickson, 2017). Otro tipo de células en el epitelio intestinal son las quimiosensoriales que juegan un papel clave en la defensa contra helmintos y células M, al encargarse de captar y presentar los antígenos luminales al sistema inmune. (Allaire y cols., 2018).

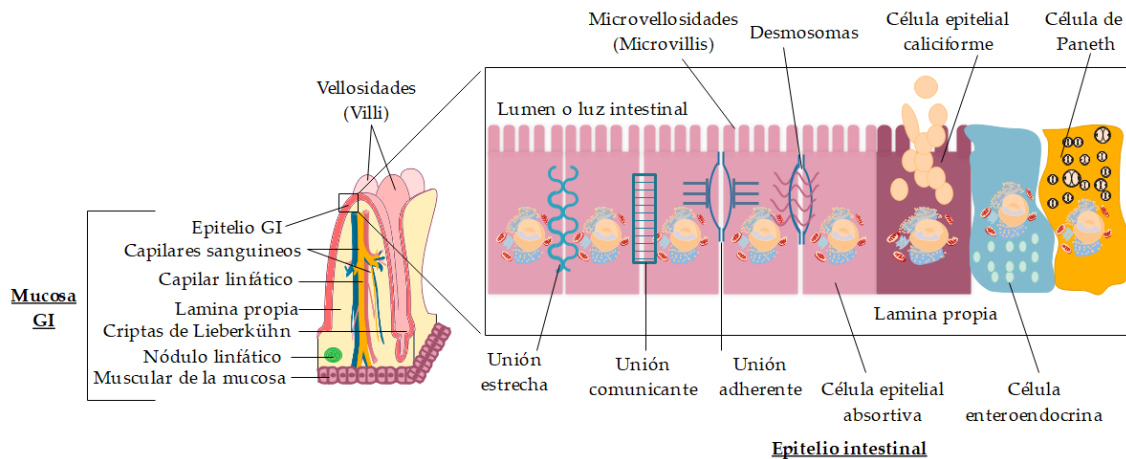


Figura 3. Mucosa Gastrointestinal (GI) y detalle del epitelio intestinal. Editado con Edraw™ Max 9.4.

Las células del epitelio GI están unidas, formando una población celular intercomunicada entre sí. La red de comunicaciones intercelulares, tal y como esquematiza la figura 3, está formada por distintos tipos de uniones: uniones estrechas, uniones comunicantes, uniones adherentes y desmosomas (Alberts y cols. 2011). Las uniones estrechas constituyen el componente más apical de la red intercelular de uniones, formado por la asociación de las membranas de células epiteliales adyacentes dando lugar a una estructura que actúa como una barrera paracelular que regula el movimiento del agua y solutos entre capas epiteliales. Forman barreras físicas y químicas que sellan las células vecinas que forman una capa epitelial que impide el transporte de ciertas toxinas bacterianas a través del epitelio debido a sus funciones de barrera. Las uniones adherentes son complejos proteicos caracterizados por una posición cercana de las membranas plasmáticas de células vecinas (aproximadamente 10-20 nm), con moléculas intercelulares en forma de barra, y filamentos de actina condensados en el lado citoplasmático de las uniones; unen un filamento de actina de una célula con uno similar de una célula vecina. Tanto las uniones adherentes como las uniones estrechas ayudan a sellar el espacio entre las células,

pero las uniones adherentes son generalmente más basales. (Welcome, 2018). Los desmosomas unen o conectan los filamentos de queratina de una célula con los de otra. Tanto uniones adherentes como desmosomas se forman alrededor de proteínas transmembrana que pertenecen a la familia de las cadherinas, una molécula de cadherina presente en la membrana plasmática de una célula se une en forma directa con una molécula de cadherina idéntica situada en la membrana plasmática de la célula vecina (Figura 4).

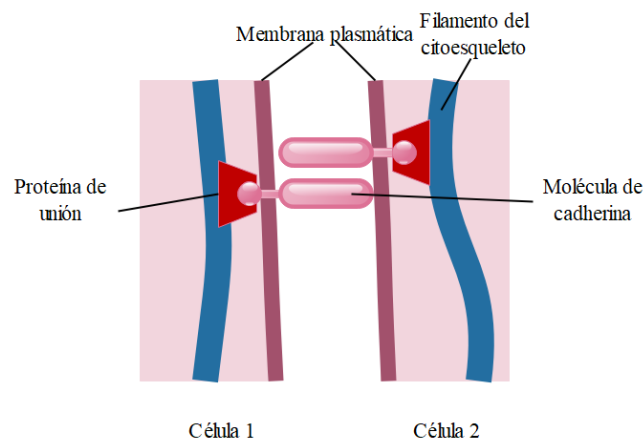


Figura 4. Moléculas de cadherina que median en la unión mecánica entre las células adyacentes. Editado con Edraw™ Max 9.4.

Esta clase de unión denomina *homófila*, en el caso de las cadherinas, también requiere Ca^{2+} en el medio extracelular, lo que determina el nombre de la molécula. En una unión adherente cada molécula de cadherina está anclada al interior de la célula con filamentos de actina a través de varias proteínas de conexión, formando una banda de adhesión continua que rodea cada célula epitelial que interactúa en la unión, ese cinturón se localiza cerca del extremo apical de la célula, justo debajo de las uniones estrechas. Los filamentos de actina conectan las células a través de todo el epitelio (Figura 5). Esta red puede contraerse y otorga al epitelio capacidad de desarrollar tensiones (Alberts y cols. 2011).

Las uniones comunicantes forman canales que permiten el paso de iones y moléculas hidrosolubles pequeñas entre células, regulan el flujo de moléculas pequeñas como iones (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), segundos mensajeros (cAMP, cGMP e inositol 1,4,5-trifosfato), metabolitos (glucosa, glutamato, Adenosina, AMP, ADP, ATP y glutatión), así como el acoplamiento químico y eléctrico entre células adyacentes. (Welcome, 2018).

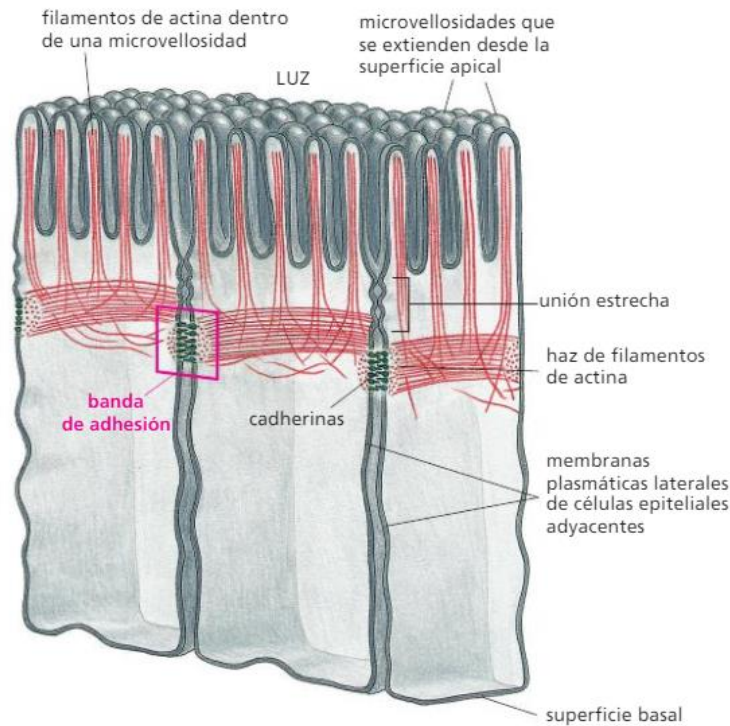


Figura 5. Uniones adherentes que forman bandas similares a cinturones alrededor de las células epiteliales en el intestino delgado. (Alberts y cols. 2011).

Gracias a los diferentes tipos de uniones, el epitelio intestinal cumple funciones diametralmente opuestas: barrera y absorción, y lo logra a pesar de estar formado por una sola capa de células.

La pared del intestino grueso contiene las cuatro capas típicas que se hallan en el resto del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa consiste en un epitelio cilíndrico simple, lámina propia (tejido conectivo laxo) y muscular de la mucosa (músculo liso). El epitelio contiene sobre todo células absortivas y caliciformes. Las absortivas funcionan principalmente en la absorción de agua; las caliciformes secretan mucus que lubrica el pasaje del contenido colónico. Ambas están situadas en largas glándulas tubulares rectas del intestino (criptas o glándulas de Lieberkühn) que abarcan todo el espesor de la mucosa. En comparación con el intestino delgado, la mucosa del intestino grueso no tiene tantas adaptaciones estructurales para aumentar el área superficial. Carece de pliegues longitudinales y de vellosidades; sin embargo, si hay microvellosidades en las células absortivas. Por lo que la mayor parte de la absorción se produce en el intestino delgado, no en el grueso.

La pared del estómago está compuesta por las mismas tres capas clásicas que el resto del tubo digestivo, con algunas modificaciones. La superficie de la mucosa gástrica es una capa simple de células epiteliales cilíndricas denominadas células mucosas superficiales. Las células epiteliales se extienden hasta la lámina propia, donde forman columnas de células secretoras denominadas glándulas gástricas. Varias de estas glándulas se abren en el fondo de estrechos canales llamados fosas gástricas. La secreción de varias glándulas gástricas fluye al interior de cada fosa gástrica y de allí, a la luz del estómago. Las glándulas gástricas contienen tres tipos de células que secretan sus productos a la luz gástrica: células mucosas del cuello, células principales y parietales. Las mucosas superficiales y las células mucosas del cuello secretan moco. Las parietales producen el factor intrínseco (necesario para la absorción de la vitamina B12) iones hidrógeno (H^+) e iones cloruro (Cl^-) por separado, los envía a la luz gástrica dando como resultado la secreción de ácido clorhídrico (HCl). Las bombas de protones energizadas por H^+ -K ATPasas transportan activamente H^+ a la luz, al tiempo que ingresan iones de potasio (K^+) a la célula. A la vez, Cl^- y K^+ difunden hacia la luz por medio de canales de Cl^- y K^+ en la membrana apical. Las células parietales además contienen anhidrasa carbónica, enzima que cataliza la formación de ácido carbónico (H_2CO_3) a partir de agua (H_2O) y dióxido de carbono (CO_2). Cuando el H_2CO_3 se disocia, suministra una fuente de iones H^+ para las bombas de protones y genera iones bicarbonato HCO_3^- , que se intercambia por iones Cl^- a través de un contratransportador Cl^- - HCO_3^- presente en la membrana basolateral (adyacente a la lámina propia). Todo el proceso se esquematiza en la figura 6. Las células principales (cimógenas) secretan pepsinógeno y lipasa gástrica. Las secreciones de las células mucosas, parietales y principales constituyen el jugo gástrico. Además, las glándulas gástricas incluyen un tipo de célula enteroendocrina, la célula G, que secreta gastrina, hormona que estimula varios aspectos de la actividad gástrica. (Tortora y Derrickson, 2017).

El líquido fuertemente ácido del estómago es esencial en la digestión ya que desnaturaliza parcialmente las proteínas de los alimentos y estimula la secreción de hormonas que promueven el flujo de bilis y jugo pancreático. También participa en el control de los microorganismos contenidos en los alimentos. La única enzima proteolítica del estómago es la pepsina, secretada por las células principales. La pepsina es más eficiente en un ambiente como el del estómago, muy ácido con un pH de 2, a pH más altos es inactiva. (Tortora y Derrickson, 2017).

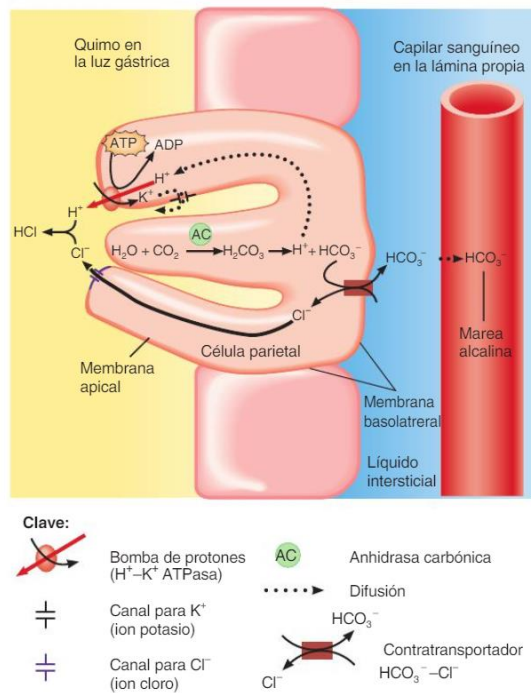


Figura 6. Secreción de HCl (ácido clorhídrico) por las células parietales del estómago. (Tortora y Derrickson, 2017).

1.1.3. Elementos de defensa de la mucosa gástrica.

El mantenimiento de la homeostasis de la mucosa del estómago está asociado, entre otros, a los elementos de defensa que encontramos a 3 niveles diferentes: elementos preepiteliales, epiteliales y subepiteliales.

Dentro de los elementos preepiteliales tenemos la capa de moco y bicarbonato que actúa como una barrera fisicoquímica contra múltiples moléculas. Como recoge el punto anterior, la totalidad de la superficie de la mucosa gástrica existente entre las glándulas posee una capa continua de células mucosas del cuello, encargadas de secretar un moco viscoso para cubrir las células epiteliales. El grosor de esta capa es casi siempre mayor de 1 mm³. Los componentes principales son mucinas (glicoproteínas), bicarbonato (HCO₃⁻), lípidos y agua (95%). El moco gástrico está dispuesto en dos capas, una interna también denominada moco visible que forma un recubrimiento gelatinoso con una alta concentración de bicarbonato para mantener un pH neutral (7.0), protegiendo a la mucosa del ácido corrosivo, retardando la difusión retrógrada de iones hidrógeno (H⁺) y manteniendo el HCO₃⁻ secretado por el epitelio. Las moléculas de mucina contenidas en esta capa se entrelazan por puentes disulfuro confiriéndole una consistencia altamente viscosa y con la capacidad de expansión al hidratarse. La capa externa o moco soluble es

menos viscosa debido a la falta de enlaces disulfuro entre las moléculas de mucina que contiene. Esta capa se encarga de la liberación constante de óxido nítrico (NO) y de la unión con agentes nocivos, se mezcla con los alimentos y se desprende. El estímulo para el engrosamiento de ambas capas es distinto, pero ambas responden al estímulo de la prostaglandina E2 (PGE2) (Díaz-Casasola, 2015).

Los elementos epiteliales de defensa son los transportadores iónicos que mantienen el pH intracelular, la producción de moco, HCO_3^- , péptidos trefoil y proteínas de choque térmico. Estas últimas impiden la desnaturalización de proteínas, protegiendo a las células de ciertos factores como el aumento de temperatura, agentes citotóxicos o del estrés oxidativo. La exposición de la mucosa a diversos agentes agresores puede causar un desequilibrio entre la pérdida y la renovación celular. Cuando se presenta el daño, en la restitución celular intervienen factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor), el factor transformador del crecimiento (TGF, del inglés transforming growth factor) α y β , el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF, del inglés fibroblast growth factor) y los factores trefoil. El receptor de EGF (EGFR) es una proteína transmembrana al que también se unen otros ligandos como el TGF, la anfirregulina (AR) y la betacelulina (BTC). En muchos estudios el efecto que tiene el EGF sobre la mucosa no dañada es insignificante, esto se atribuye a que el EGFR en las células epiteliales está restringido a la superficie basolateral, por lo que únicamente existe interacción ligando-receptor cuando hay un daño. Por otra parte, al mismo tiempo que ocurre la renovación epitelial tiene lugar la angiogénesis cuyos principales reguladores son el FGF, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés vascular endothelial growth factor) y las prostaglandinas (Díaz-Casasola, 2015).

Los factores trefoil (TFF, trébol) son una familia de péptidos que comparten una secuencia conservada de 40 aminoácidos denominada trébol (*trefoil*) o dominio de tipo P, consistente en una estructura con forma de tres hojas de trébol compuesta de bucles covalentes estabilizados a través de enlaces disulfuro internos en Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6. Esta conformación aumenta la resistencia a la degradación por las proteasas, el ácido y el calor, dando como resultado, péptidos TFF estructural y funcionalmente estables. Hay tres tipos de TFF en mamíferos: TFF1 (nombre original: péptido asociado al cáncer de mama, pS2), TFF2 (nombre original; polipéptido espasmolítico pancreático, PSP) y TFF3 (nombre original; factor de trébol intestinal, ITF). TFF1 se expresa predominantemente en células foveolares gástricas y células

epiteliales del estómago, también se detecta en los conductos superiores de las glándulas de Brunner, en los jugos gástricos, esófago, intestino delgado y colon. TFF2 se expresa en células epiteliales en las glándulas gástricas y regiones estomacales antrales, en las células del cuello mucoso gástrico y en la glándula duodenal de Brunner. TFF3 se expresa predominantemente dentro de las células caliciformes en el intestino delgado y el colon (Eitaro y cols., 2017). Numerosos estudios sugieren que los TFF están involucrados en procesos de proliferación, migración y angiogénesis celular relacionados con procesos de cicatrización. Además, se ha demostrado que interactúan con mucinas e interfieren en procesos de inflamación; la interacción con las mucinas protege al epitelio contra agentes nocivos, al disminuir la penetración de protones a través del moco y al aumentar su viscosidad. Lo que no se ha establecido es el mecanismo de acción, ni la relevancia fisiológica de estos péptidos (Kjellev, 2009).

Los elementos subepiteliales presentes en la microvasculatura subepitelial tienen el efecto protector más importante de la mucosa gástrica. Mantiene el flujo sanguíneo ininterrumpido hacia las células epiteliales, sirviendo como medio de transporte de nutrientes y productos de desecho, además de ser una importante fuente productora de prostaglandinas (Díaz-Casasola, 2015).

1.2. Biodisponibilidad oral y absorción intestinal.

La oral es la vía más común y aceptada de administración de fármacos. Entre las numerosas ventajas que supone se incluye la facilidad de cumplimiento por parte del paciente, conveniencia y un buen balance coste-efectividad.

La comprensión y la predicción de la absorción oral de fármacos es de gran utilidad e interés para el desarrollo de medicamentos. Obviamente, el establecimiento de un marco integral en el que las propiedades fisicoquímicas de los fármacos candidatos estén cuantitativamente relacionados con su grado de absorción acelera la selección de candidatos durante la fase de descubrimiento/desarrollo preclínico. Además, dicho marco ayuda a las agencias reguladoras a desarrollar pautas (guías) con base científica de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de cada fármaco para gestionar varios aspectos de la absorción oral de medicamentos, por ejemplo, disolución, correlaciones *in vitro-in vivo* o bioexenciones en estudios de bioequivalencia. Sin embargo, las complejas interrelaciones entre las propiedades y los procesos de los medicamentos en el tracto GI dificultan la predicción de la absorción oral, un proceso complejo que depende de

propiedades del fármaco, como su solubilidad y permeabilidad, factores de formulación y de variables fisiológicas que incluyen diferencias regionales de permeabilidad, pH luminal, enzimas mucosas, y motilidad intestinal, entre otros (Macheras e Iliadis, 2006).

La acción farmacológica de un fármaco depende de su concentración en lo que se denomina biofase, que es el medio en el cual el fármaco puede interactuar con sus receptores y así ejercer su efecto biológico, sea este terapéutico o tóxico. La concentración tisular de un fármaco es difícil de medir, pero se acepta la existencia de una relación directa entre la acción farmacológica de un fármaco y sus niveles plasmáticos. La concentración en la biofase de fármacos de formas de administración oral está condicionada por la liberación desde la forma farmacéutica, y varía a lo largo del tiempo, como resultado de un equilibrio dinámico entre los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (Lorenzo y cols., 2017). Por ello, la biodisponibilidad oral, que constituye la fracción de una dosis administrada vía oral de fármaco inalterado que llega al flujo sanguíneo (circulación sistémica) (Doménech y cols., 2001), es una de las consideraciones más importante para el desarrollo exitoso de medicamentos orales. La biodisponibilidad depende de numerosos factores, entre ellos, de la formulación que lo contiene, de factores inherentes a la propia sustancia, como sus propiedades fisicoquímicas o sus características farmacocinéticas y del paso del fármaco a través de membranas biológicas, que en el caso de medicamentos orales es el paso o permeación a través de la membrana intestinal.

1.2.1. Farmacocinética: Generalidades.

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que es sometido un fármaco a través de su paso por el organismo. Dichos procesos son conocidos con el acrónimo LADME, y son: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (Doménech y cols. 2013).

La figura 7 esquematiza todo el proceso desde la liberación de la forma farmacéutica hasta la eliminación del fármaco bien sea por biotransformación debida a un proceso metabólico en el organismo o a su excreción.

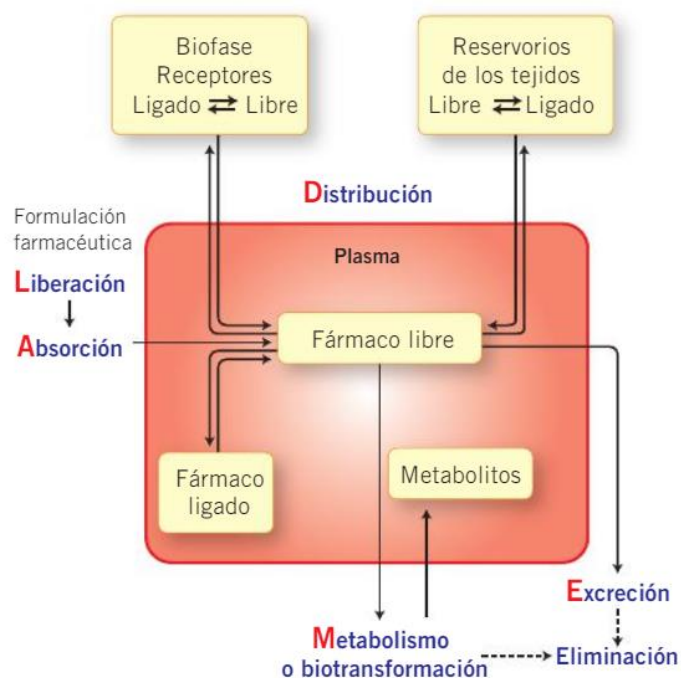


Figura 7. Esquema de paso a través del organismo de un fármaco, desde su liberación de la forma farmacéutica hasta su eliminación. (Lorenzo y cols., 2017).

Los estudios farmacocinéticos se basan en la determinación y representación gráfica de las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos biológicos tras su administración y durante un tiempo determinado. Debido a que los seres vivos son sistemas complejos, resulta complicado establecer relaciones cuantitativas entre la dosis administrada, la concentración en los distintos tejidos y el tiempo transcurrido. Por este motivo, para describir la evolución del fármaco en el organismo en el tiempo, se recurre a modelos farmacocinéticos, así, mediante ecuaciones matemáticas se estudian las velocidades de los procesos de absorción, distribución y eliminación del fármaco. Existen dos clases de modelos farmacocinéticos, los no compartimentales y los compartimentales.

En el modelo no compartimental o modelo-independiente, el tratamiento de los datos permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustarlos a un modelo determinado. Este es el tipo de análisis que se realiza para los estudios de bioequivalencia, en los que se requiere la determinación del área bajo la curva (AUC), la concentración máxima (C_{max}) y el tiempo al que se obtiene la concentración máxima (t_{max}) (Doménech y cols. 2013).

En los modelos compartimentales, el concepto de compartimento no es un concepto anatómico sino cinético, que engloba las distintas zonas del organismo que poseen

propiedades cinéticas parecidas y en las que se supone una distribución uniforme del fármaco (Doménech y cols., 2001). Un compartimento se define por sectores acuosos con un volumen determinado (V_d), que contienen una determinada cantidad de fármaco (Q), de forma que la concentración en este compartimento viene dada por la ecuación 1.

$$C = \frac{Q}{V_d} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Debido a que el organismo es muy complejo y podrían llegar a contabilizarse muchos compartimentos distintos, en la práctica se tiende a considerar el organismo constituido por el número menor de compartimentos posibles que permitan hacer una descripción adecuada del comportamiento cinético del fármaco (Doménech y cols., 2001).

Los modelos farmacocinéticos lineales más utilizados son el monocompartimental y bicompartimental.

Según el modelo monocompartimental el organismo estaría compuesto por un único compartimento, considerándose la distribución del fármaco en el organismo instantánea y uniforme, con una eliminación desde tiempo 0. La Figura 8 representa el esquema del modelo suponiendo la administración intravenosa (IV).

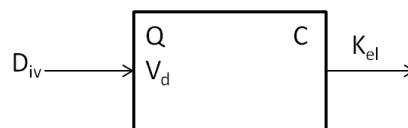


Figura 8. Representación esquemática del modelo monocompartimental suponiendo la administración de bolus IV.

La ecuación 2, representa las variaciones en las cantidades de fármaco en función el tiempo para el modelo monocompartimental.

$$\frac{dQ}{dt} = -K_{el} \cdot Q \quad (\text{Ecuación 2})$$

Siendo K_{el} la constante de eliminación del fármaco.

En el caso de una administración extravasal, como sería la administración oral, el modelo debe considerar el proceso de absorción del fármaco tal como muestra la Figura 9 y la Ecuación 3.

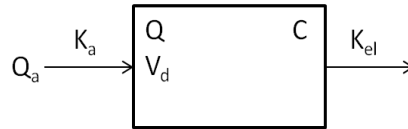


Figura 9. Representación esquemática del modelo monocompartimental
Suponiendo una administración extravasal.

$$\frac{dQ}{dt} = K_a \cdot Q - K_{el} \cdot Q \quad (\text{Ecuación 3})$$

Siendo K_a , la constante de absorción.

Para este modelo la cantidad de fármaco existente en el organismo a un tiempo determinado (Q) viene dado por la ecuación 4.

$$Q = Q_0 \cdot e^{K_{el} \cdot t} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde, Q_0 es la cantidad de fármaco a tiempo 0.

Debido a la complejidad anatómo-fisiológica de los mamíferos, casi ningún fármaco se ajusta a un modelo monocompartimental, ya que la distribución habitualmente no es instantánea ni uniforme tras su administración. Por eso, para describir el comportamiento de la mayoría de los fármacos acostumbra a ser necesario un modelo más complejo, el bicompartimental. El modelo cinético bicompartimental asume que la distribución del fármaco no es instantánea y que los tejidos que tienen un mayor flujo o aporte sanguíneo, alcanzan más rápidamente el equilibrio de distribución que los que tienen menor aporte. Partiendo de esta premisa, se distinguen por tanto el compartimento central, que lo componen los tejidos en los que el equilibrio de distribución se produce rápidamente y un compartimento periférico, que lo componen los tejidos en los que tarda más tiempo en alcanzarse el equilibrio de distribución (Doménech y cols., 2001). En la Figura 10 está representado el esquema de este modelo para una administración IV.

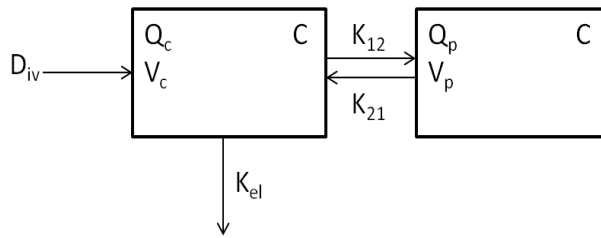


Figura 10. Representación esquemática del modelo bicompartimental suponiendo la administración de un bolus IV.

La Ecuación 5, muestra la ecuación del modelo bicompartimental de un bolus IV que describe las variaciones en las cantidades de fármaco en el compartimento central en función el tiempo.

$$\frac{dQ_C}{dt} = K_{21} \cdot Q_P - K_{12} \cdot Q_C - K_{el} \cdot Q_C \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde K_{12} es la constante de distribución del fármaco desde el compartimento central al compartimento periférico y K_{21} es la constante de retorno desde el compartimento periférico al central.

Si consideramos una administración extravasal del fármaco, como en el caso de la administración oral, el modelo y su ecuación son las siguientes (Figura 11 y Ecuación 6).

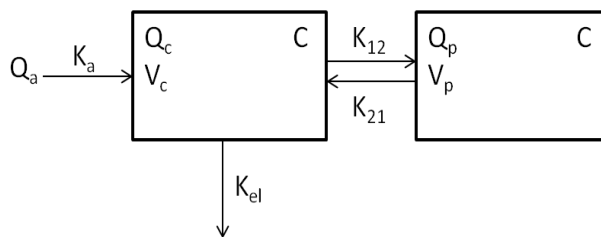


Figura 11. Representación esquemática del modelo bicompartimental suponiendo una administración extravasal.

$$\frac{dQ_C}{dt} = K_a \cdot Q_a + K_{21} \cdot Q_P - K_{12} \cdot Q_C - K_{el} \cdot Q_C \quad (\text{Ecuación 6})$$

En resumen, cuando el fármaco se administra por vía IV, éste se distribuye instantáneamente en el compartimento central. Desde el cual, según la constante de distribución, pasa al compartimento periférico. De este compartimento periférico, el fármaco también puede volver al central, según la constante de retorno. Además, se

considera que el proceso de eliminación del fármaco se produce principalmente desde el compartimento central, según la constante de eliminación. Por lo tanto, el fármaco desaparece del compartimento central a través de dos mecanismos, por la distribución de éste al compartimento periférico y por su eliminación en lo que se conoce como proceso de disposición (Doménech y cols., 2001).

Centrándonos en la administración oral (vía extravasal) los dos primeros procesos a considerar son la liberación desde su forma farmacéutica y la absorción intestinal del fármaco. Tal y como se comenta al inicio de la sección, la absorción juega un papel fundamental en la determinación de la biodisponibilidad (F), ya que matemáticamente puede ser representada por la ecuación 7.

$$F = Fa \times Fg \times Fh \quad (\text{Ecuación 7})$$

Siendo Fa la fracción absorbida de fármaco, Fg la fracción que escapa del metabolismo en el tubo tracto digestivo y Fh es la fracción que escapa al metabolismo hepático de primer paso. Por lo tanto y basado en la ecuación 7, uno de los principales factores que afectan a la biodisponibilidad oral es la fracción de fármaco absorbido. La absorción oral de fármacos que ocurre principalmente en el intestino delgado está determinada por tres factores: la permeabilidad, la solubilidad y la disolución (Balimane y Chong, 2008).

La disolución es el proceso por el cual un compuesto químico pasa desde el estado sólido al estado solución, y puede ser caracterizado por la velocidad de disolución (cantidad de compuesto disuelta por unidad de tiempo). La solubilidad, en cambio se refiere a la cantidad disuelta de un compuesto químico en equilibrio con ese mismo compuesto en estado sólido, a presión y temperatura definidas (solubilidad de saturación) (Talevi y cols., 2016)

1.2.2. Solubilidad.

La solubilidad es la propiedad fisicoquímica más importante que puede afectar la absorción de un fármaco, ya que las moléculas de fármaco tienen que estar disueltas para que ocurra la absorción en el tracto intestinal. La solubilidad de un soluto es la cantidad máxima de soluto que puede disolverse en una cierta cantidad de disolvente o cantidad de solución a una temperatura determinada. El grado de ionización y el coeficiente de reparto K octanol/agua (también llamado coeficiente de partición) del fármaco

contribuyen a la solubilidad y la permeabilidad de la membrana. En general, un valor bajo de coeficiente de reparto indica alta solubilidad en agua, mientras que un valor alto indica alta solubilidad en lípidos. Por otro lado, los fármacos liposolubles, generalmente poseen una alta permeabilidad de membrana. La ionización y el pH desempeñan un papel importante en la solubilidad del fármaco. La forma ionizada suele ser más soluble en agua, pero la forma desionizada es más fácilmente absorbida en el tracto GI por difusión pasiva. Para fármacos débilmente básicos, predomina la forma desionizada en el intestino donde el pH es alto (5–8), favoreciendo su absorción. En los débilmente ácidos predomina la forma ionizada en el intestino. Aunque en teoría para un ácido débil ionizado la absorción en el intestino no es favorable, la gran área de absorción que supone la superficie intestinal lo compensa dando lugar a la absorción completa de este tipo de fármacos (Balimane y Chong, 2008).

La mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles, es decir, electrolitos que en solución acuosa se encuentran en 2 formas: ionizada o no ionizada. Como se ha comentado la fracción ionizada es hidrosoluble y poco difusible si el tamaño del ión es grande. Por el contrario, la fracción no ionizada es liposoluble y difunde bien a través de la membrana celular. Los factores más importantes que condicionan la ionización son la naturaleza ácida o básica de la molécula, su pK (logaritmo negativo de la constante de disociación) y el pH del medio (Lorenzo y cols., 2017).

Las ecuaciones de Henderson-Hasselbach relacionan el pK de una sustancia y el pH del medio, conociendo la fracción de fármaco que se ioniza y la que permanece sin ionizar. Un ácido (AH) se disocia en su forma ionizada (A⁻) y libera protones, según la ecuación: $AH \leftrightarrow A^- + H^+$, que es bidireccional. Puede establecerse la constante de disociación del ácido (K_A) aplicando la ley de acción de masas y operando se llega a la primera de las ecuaciones:

$$K_A = [A^-][H^+]/[AH]$$

$$PK_A = -\log [A^-][H^+]/[AH]$$

$$= \log [AH]/[A^-] + \log 1/[H^+]$$

$$= \log [AH]/[A^-] + pH$$

Una base (BOH) se disocia en su forma ionizada (B⁺) y genera radicales oxhidrilo, según la ecuación: $BOH \leftrightarrow B^+ + OH^-$, que es también bidireccional. Puede establecerse la

constante de disociación de la base (K_b) aplicando la ley de acción de masas, y operando se llega a la segunda ecuación. Para ello, hay que tener en cuenta que, en una solución neutra, a 25°C, la concentración de protones es igual a la de hidrogeniones, y ambas son iguales a 10^{-7} .

Para llegar a esta segunda ecuación, también hay que considerar que el $pK_A + PK_b = 14$

$$\begin{aligned}
 K_b &= [B^+][OH^-]/[BOH] \\
 pK_b &= \log [BOH]/[B^+][OH^-] \\
 &= \log [BOH][H^+]/[B^+]10^{-14} \\
 &= \log [BOH]/[B^+] + \log [H^+] + 14; \quad 14 - pK_b = pK_A \\
 pK_A &= -\log [BOH]/[B^+] - \log [H^+] \\
 &= \log [B^+]/[BOH] + pH
 \end{aligned}$$

Resultan, por lo tanto, las siguientes ecuaciones:

Para ácidos:

$$pK_A = \log \frac{[\text{ácido no ionizado}]}{[\text{ácido ionizado}]} + pH \quad (\text{Ecuación 8})$$

Para bases:

$$pK_A = \log \frac{[Base\ ionizada]}{[Base\ no\ ionizada]} + pH \quad (\text{Ecuación 9})$$

De la ecuación 8 deducimos que un ácido con pK_A bajo es un ácido muy disociable, por lo tanto, muy fuerte. Un ácido con pK_A alto es un ácido débil que se ioniza con dificultad. De la ecuación 9 deducimos que las bases con pK_A alto son bases fuertes, muy disociables, y las bases con pK_A bajo son bases débiles que se ionizan con dificultad. Los ácidos con pK_A alto y las bases con pK_A bajo, ácidos y bases débiles, se absorben y atraviesan mejor las membranas.

Cuando el pH es igual al pK_A , los fármacos se encuentran disociados al 50%. Por lo tanto, la absorción en el tubo digestivo y la reabsorción en el epitelio renal pueden modificarse si se altera el pH del medio. Esto tiene relevancia terapéutica, puesto que el pH del contenido gástrico, que normalmente está entre 1 y 3 en ayunas, se eleva hasta 5 en el

periodo postprandial. Fármacos como los antiácidos pueden alterar notablemente el pH gástrico y modificar la absorción de otros fármacos que se administren conjuntamente. (Lorenzo y cols., 2017).

1.2.3. Liberación: Disolución

La disponibilidad oral de un medicamento en el organismo depende de su capacidad para disolverse en los fluidos GI. La velocidad de disolución es el paso limitante por lo que cualquier factor que afecte la velocidad de disolución tendrá un impacto en la biodisponibilidad.

El paso básico en la disolución del fármaco es su reacción con el fluido y/o los componentes del medio de disolución. Dicha reacción tiene lugar en la denominada interfaz sólido-líquido, por lo que la cinética de disolución depende de 3 factores: la velocidad de flujo del medio de disolución hacia la interfaz sólido-líquido, la velocidad de reacción en la interfaz y la difusión molecular del fármaco disuelto desde la interfaz a la solución. Los 3 procesos se esquematizan en la figura 12 (Macheras e Iliadis, 2006)

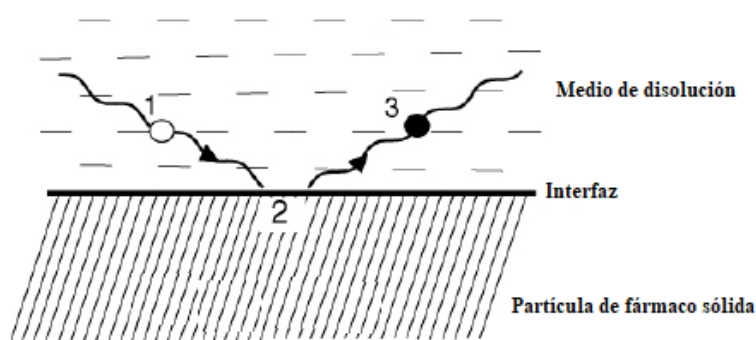


Figura 12. Esquema de disolución de un fármaco. (1) Las moléculas (◦) de solvente y/o los componentes del medio de disolución se mueven hacia la interfaz; (2) adsorción; (3) las moléculas de fármaco disueltas (•) se mueven hacia el medio de disolución. (Macheras e Iliadis, 2006)

La hidrodinámica de las condiciones *in vivo* y la compleja composición de los fluidos GI que depende del tiempo y su localización en el aparato digestivo complica el estudio de los fenómenos de disolución, en particular cuando se intenta desarrollar una correlación *in vitro-in vivo*. Los primeros estudios en este campo formularon dos modelos principales para la interpretación del mecanismo de disolución: El modelo de la capa de difusión y el

modelo de barrera interfacial. Ambos modelos suponen que hay una capa de líquido estanca en contacto con el sólido, Figura 13.

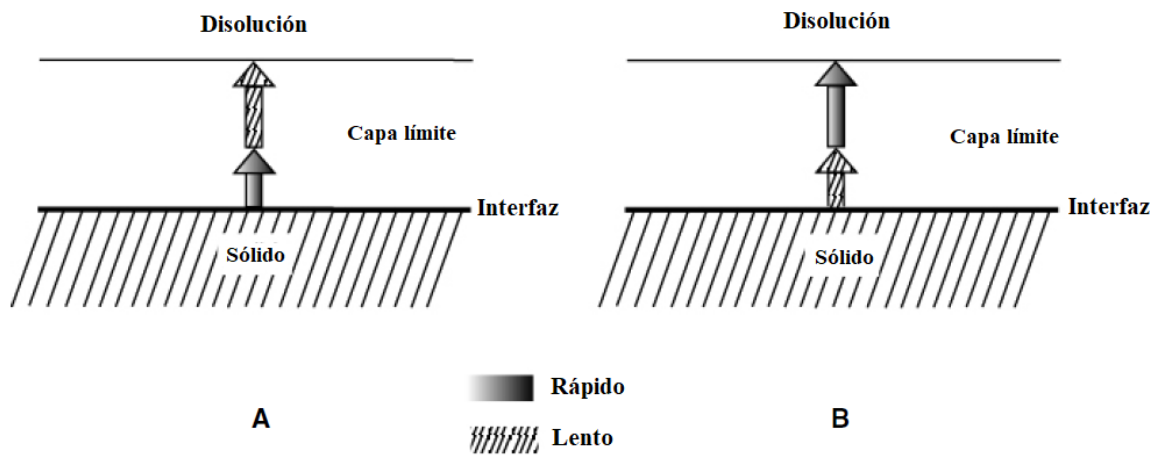


Figura 13. Representación esquemática de los mecanismos de disolución según a: (A) el modelo de capa de difusión, y (B) el modelo de barrera interfacial. (Macheras e Iliadis, 2006)

Según el modelo de la capa de difusión (Figura 13 A), el paso que limita la velocidad de disolución es la tasa de difusión de las moléculas del fármaco disuelto a través de la capa líquida estanca (capa límite) en lugar de la reacción en la interfaz sólido-líquido. Para el modelo de barrera interfacial (Figura 13 B), el paso limitante es la transferencia inicial del fármaco desde la fase sólida a la solución, es decir, la reacción en la interfaz sólido-líquido (Macheras e Iliadis, 2006)

El modelo más simple para definir la velocidad de disolución es la ecuación de Noyes-Whitney (ecuación 10):

$$\frac{dm}{dt} = k (C_s - C) ; C = 0 \text{ en condiciones } \textit{sink} \text{ o sumidero (Ecuación 10)}$$

Siendo dm/dt la tasa o velocidad de disolución del sólido; k la constante de proporcionalidad; C_s la solubilidad del fármaco en el medio de disolución; C la concentración de fármaco en el seno del medio de disolución.

A partir de la ecuación anterior, Nernst y Brunner descompondrían la constante de proporcionalidad k expresándola en términos del área de la superficie expuesta al solvente A , el coeficiente de difusión D y el espesor de la capa de difusión, h . Dando lugar a la ecuación 11, modelo de Noyes-Whitney-Nernst-Brunner:

$$\frac{dm}{dt} = A \frac{D}{h} (C_s - C) ; C = 0 \text{ en condiciones } \textit{sink} \text{ o sumidero (Ecuación 11)}$$

Siendo dm/dt la tasa o velocidad de disolución del sólido; A el área del sólido; D el coeficiente de difusión; h el grosor de la capa límite no agitada; C_s la solubilidad en agua del fármaco; C la concentración de fármaco en h (Balimane y Chong, 2008; Alfonso, 2003).

Para mejorar la velocidad de disolución en fármacos con baja solubilidad, se emplean distintas estrategias de formulación como la micronización que aumenta A , la ionización que aumenta C_s o la adicisolubilización (tensioactivos) entre otros.

Aunque velocidad de disolución y solubilidad son cosas distintas, existe una relación directa entre ambas, a mayor solubilidad en el medio de disolución, más rápidamente tenderá a ocurrir el proceso de disolución. No obstante, en el caso de fármacos muy solubles en el medio en cuestión, podríamos encontrarnos con una disolución lenta, por ejemplo, si las partículas sólidas son muy grandes y presentan una superficie expuesta relativamente baja, o si D es demasiado bajo. Además, tal y como indican ambas ecuaciones, que pueden aplicarse directamente en el caso de un sistema cerrado (por ejemplo, un sistema *in vitro*), podrían simplificarse en la disolución *in vivo* teniendo en cuenta que las moléculas disueltas serían transportadas hacia la sangre desde el sitio de absorción. Si la absorción del principio activo ocurre rápidamente, $C \ll C_s$ y podrá desprejarse ($C=0$), condición que conocemos como condiciones “*sink*” o sumidero. Para modelos *in vitro* podremos asumir condiciones “*sink*” cuando la concentración de soluto en el seno de la solución, C , suponga como máximo un 20% de C_s (Talevi y cols., 2016).

Aunque el modelo de la capa de difusión es el más utilizado, se han propuesto varias modificaciones del mismo y actualmente este se basa en la llamada capa límite efectiva de difusión, cuya estructura es muy dependiente de las condiciones hidrodinámicas. La teoría de la convección-difusión demuestra que la transferencia de sólido a la solución se controla mediante una combinación de flujo de líquido y difusión. Es decir, tanto la difusión como la convección contribuyen a la transferencia del fármaco desde la superficie sólida a la solución. Cabe destacar que esto se aplica incluso en condiciones moderadas de agitación (Macheras e Iliadis, 2006).

1.2.4. Permeabilidad: Coeficiente de permeabilidad efectiva (Peff), Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp), fracción de fármaco absorbido (F_a) y constante de absorción (K_a).

La permeabilidad se define como la velocidad a la que se transporta una molécula a través de una membrana (cm/s) independientemente del tipo de mecanismo de transporte (Dahlgren, D., 2015), y se describe comúnmente de 2 formas diferentes, con la permeabilidad efectiva (Peff) y la permeabilidad aparente (Papp).

El Peff es una medición directa de la permeabilidad de un compuesto farmacológico a través de la membrana apical de las células del epitelio intestinal que se determina midiendo la desaparición del fármaco de la luz intestinal por perfusión, no proporciona información sobre los procesos citosólicos dentro de las células intestinales o sobre el transporte basolateral. Este parámetro es determinado exclusivamente con experimentos *in vivo* en humano o rata; la principal ventaja es que factores como la respiración, el flujo sanguíneo y otras características fisiológicas que podrían afectar la permeabilidad se mantienen intactas (Roos, 2018).

El Papp difiere de Peff en que mide la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana, considerando no solo el transporte a través de la membrana apical, si no, también el transporte a través de la membrana basolateral, los procesos citosólicos y/o uniones intracelulares. Se determina midiendo la cantidad de fármaco que aparece en el lado basolateral (que representa la circulación sanguínea) de una membrana o monocapa celular, y generalmente se determina usando tejido intestinal extirpado de animal o humano, membranas artificiales o cultivos monocapa (Roos, 2018).

Los métodos más comunes de determinación de permeabilidad se revisan en el apartado 1.4.

Los distintos mecanismos o vías de permeación o transporte a través de la membrana intestinal que se muestran en la figura 14 incluyen la difusión transcelular pasiva, procesos de transporte mediados por transportadores, transporte paracelular y endocitosis (Balimane y Chong, 2008).

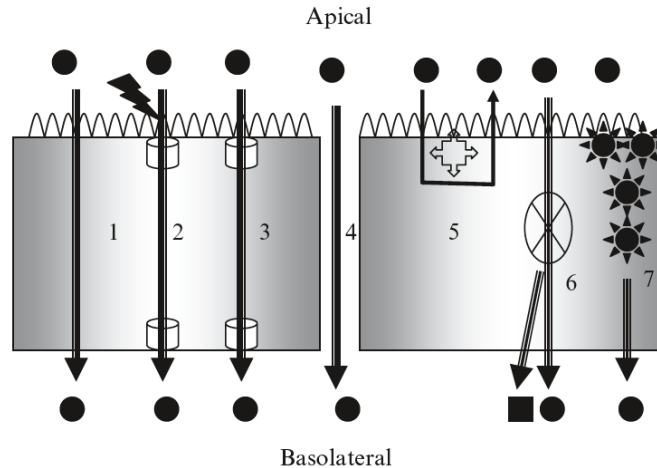


Figura 14. Distintos mecanismos de absorción intestinal: (1) transporte pasivo transcelular; (2) transporte activo transcelular; (3) difusión facilitada; (4) transporte pasivo paracelular; (5) absorción limitada por la glicoproteína-P o por otros transportadores de eflujo; (6) metabolismo de primer paso seguido de absorción de la molécula y su metabolito; (7) transporte mediado por receptores (Balimane y Chong, 2008).

En general, los compuestos lipofílicos se absorben por difusión pasiva a través del epitelio intestinal, los compuestos hidrofílicos a través de un proceso mediado por transportadores, mientras que algunos pequeños compuestos hidrofílicos pueden transportarse a través de las uniones paracelulares (Balimane y Chong, 2008).

La difusión pasiva, que es un proceso no saturable de primer orden sigue la primera ley de Fick, que matemáticamente se expresa según la ecuación 12.

$$J = \frac{dM}{A dt} = \frac{D (C_1 - C_2)}{h} \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde J es el flujo (cantidad de material que fluye a través de una sección transversal de la unidad); M , la masa del fármaco (g, mol); A , el área o superficie de permeación (cm^2); t , el tiempo (s); D , el coeficiente de difusión (difusividad, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); C_1 , la concentración del fármaco en la membrana de la pared en la luz intestinal (mol l^{-1}); C_2 , la concentración del fármaco en la pared de la membrana en la zona basal (mol l^{-1}) y h el grosor de la membrana (cm). La figura 15 esquematiza el paso a través de la membrana intestinal y los distintos parámetros de la primera ley de Fick.

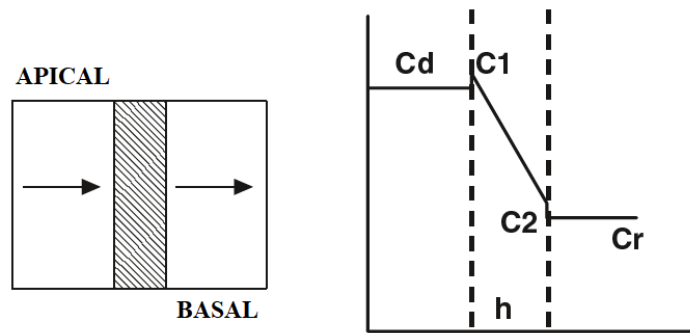


Figura 15. Esquema de la permeabilidad de un fármaco desde la zona apical a la zona basal, incluyendo los parámetros de concentración y el grosor de la membrana (h) (Cao y Cols., 2008).

Este modelo hace las siguientes suposiciones: (1) flujo en estado estacionario. La transferencia de fármaco alcanza el estado estacionario muy rápido y (2) el estado estacionario cumple las denominadas condiciones “*sink*” o *sumidero*: ambos lados de la membrana son bien agitados y son homogéneos.

Al definir el coeficiente de partición K como $K = C_1 / C_d = C_2 / C_r$ (Siendo C_d la concentración del fármaco en la luz GI y C_r la concentración de fármaco en sangre), obtenemos la ecuación 13.

$$J = D \left(\frac{KC_d - KC_r}{h} \right) = \frac{DK}{h} (C_d - C_r) \text{ (Ecuación 13)}$$

Si consideramos que $C_d \gg C_r$ obtenemos:

$$J = \frac{DK}{h} C_d \text{ (Ecuación 14)}$$

Si definimos el Coeficiente de Permeabilidad P o Permeabilidad pasiva como:

$$P_{pasiva} = \frac{DK}{h} \text{ (Ecuación 15)}$$

Obtenemos:

$$J = PC \text{ (Ecuación 16)}$$

Considerando el área de absorción, obtenemos finalmente la ecuación 17:

$$\frac{dM}{dt} = PA (C_d - C_r) \text{ (Ecuación 17)}$$

Como se ha definido en la ecuación 13, el Coeficiente de Permeabilidad o Permeabilidad pasiva (P_{pasiva}) de una molécula a través de una membrana se expresaría como:

$$P_{pasiva} = \frac{J}{C} = \frac{DK}{h} \text{ (Ecuación 18)}$$

El coeficiente de difusión (D) depende del peso molecular; tal y como se ha explicado en el apartado de solubilidad, (K) determina la liposolubilidad de la sustancia. Por lo tanto, la permeabilidad pasiva está relacionada con la membrana y las propiedades del fármaco, y debe ser una constante P_m independiente de la concentración del fármaco (Cao y Cols., 2008).

En el caso del transporte activo, la permeabilidad para la absorción activa puede ser definida por:

$$P_{activa} = \frac{J}{C} = \frac{J_{max} C}{K_m + C} \frac{1}{C} = \frac{J_{max}}{K_m + C} \text{ (Ecuación 19)}$$

Siendo J el flujo de fármaco, J_{max} el flujo máximo de fármaco; C la concentración de fármaco y K_m la afinidad del fármaco por el transportador.

Por lo tanto, la Permeabilidad Efectiva Total (P_{eff}) depende de la concentración para fármacos que se absorben tanto a través de difusión pasiva como para transporte activo y puede ser expresado por la siguiente ecuación:

$$P_{eff} = P_{pasiva} + P_{activa} = P_m + \frac{J_{max}}{K_m + C} \text{ (Ecuación 20)}$$

Sin embargo, a concentraciones muy bajas, $C \ll K_m$, la permeabilidad es independiente de la concentración:

$$P_{eff} = P_m + \frac{J_{max}}{K_m} \text{ (Ecuación 21)}$$

En contraposición, a concentraciones muy altas, $C \gg K_m$, la permeabilidad es dependiente de la concentración de fármaco:

$$P_{activa} = \frac{J}{C} = \frac{J_{max} C}{K_m + C} \frac{1}{C} = \frac{J_{max}}{K_m + C} \approx 0, \quad P_{eff} = P_m \text{ (Ecuación 22)}$$

La relación entre la permeabilidad y la concentración de fármaco para la difusión pasiva y el transporte activo se esquematiza en la figura 16.

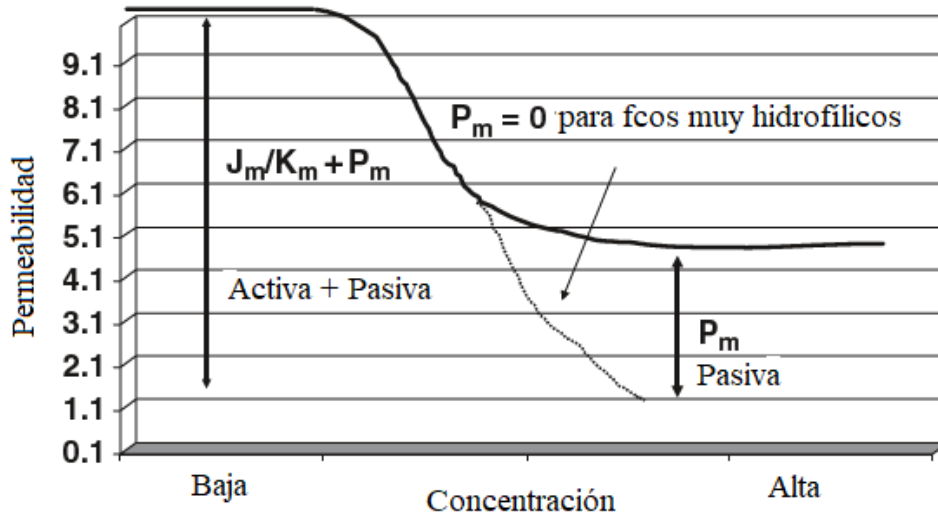


Figura 16. Permeabilidad activa y pasiva a alta y baja concentración de fármaco (Cao y Cols., 2008).

En cuanto al Papp se obtiene según la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{C_0 \cdot A} \text{ (Ecuación 23)}$$

Siendo dQ/dt la velocidad de aparición de fármaco en la cámara basolateral, tasa de transporte o flujo (J) ($\mu\text{g}/\text{min}$), A es el área de permeación de la membrana (cm^2), y C_0 es la concentración inicial de fármaco en la cámara apical ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

La permeabilidad a través de la pared intestinal, P_{eff} , es la que determina la Fracción de fármaco absorbida (F_a) según la siguiente ecuación:

$$F_a = 1 - e^{-2An}; \quad An = \frac{T_{res}}{T_{abs}}; \quad T_{abs} = \frac{R}{P_{eff}}, \text{ (Ecuación 24)}$$

Siendo T_{res} el tiempo de tránsito en el intestino delgado (~ 3 horas); T_{abs} el tiempo de absorción; R el radio del intestino delgado (2 cm) y el P_{eff} la permeabilidad a través de la pared intestinal (Cao y Cols., 2008).

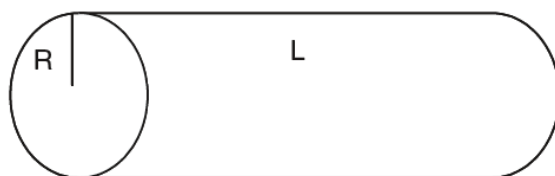


Figura 17. Modelo del compartimento de absorción intestinal (Cao y Cols., 2008).

Tal y como explica la sección 1.2.1, desde el punto de vista farmacocinético, la absorción está definida por la constante de absorción K_a , que es una constante de velocidad definida matemáticamente según la siguiente ecuación:

$$K_a = P \frac{A}{V} = P \frac{2\pi RL}{\pi R^2 L} = \frac{2P}{R} \quad (\text{Ecuación 25})$$

Siendo K_a la constante de absorción en unidades $l\ s^{-1}$; P es la permeabilidad ($cm\ s^{-1}$); A es el área de la membrana de permeación (cm^2); V es el volumen del compartimento de absorción (cm^3); R y L son el radio (cm) y la longitud (cm) respectivamente según el modelo del compartimento de absorción intestinal que esquematiza la figura 17 (Cao y Cols., 2008).

Cuando se estudia la absorción de un fármaco ya disuelto que no requiere liberación, la K_a corresponde a la constante de velocidad de absorción intrínseca. Los únicos factores de los que depende de la absorción son aquellos que condicionan la permeación a través de la membrana biológica que constituye el intestino. Cuando se estudia la absorción de un fármaco desde una forma de dosificación en la que no está disuelto y requiere liberación, la K_a corresponde a la constante de velocidad de absorción aparente.

1.2.5. Factores secundarios que influyen en la absorción oral de medicamentos.

1.2.5.1. Factores biológicos del tracto gastrointestinal.

Tiempo de vaciado gástrico

El tiempo de vaciado gástrico se refiere al tiempo necesario para que el estómago vacíe el total contenido inicial del estómago. Durante la digestión, el vaciado gástrico depende del tono de estómago proximal y píloro, que está bajo control reflejo y hormonal. En general, cualquier cosa que ralentice el vaciado gástrico probablemente disminuya la velocidad (no extensión) de la absorción del fármaco y, por lo tanto, afecta el inicio de la

respuesta terapéutica. Ciertos factores que promueven el vaciado gástrico son el hambre, recostarse sobre el lado derecho, ingesta de líquidos no calóricos, ciertos medicamentos (metoclopramida, medicamentos procinéticos) y algunos excipientes. Por otro lado, factores como las comidas (especialmente con grasas, voluminosas y alimentos viscosos), recostarse sobre el lado izquierdo, medicamentos como antidepresivos tricíclicos, anticolinérgicos, y el alcohol, retrasan el vaciado gástrico. Las formas de dosificación tipo solución y suspensión de partículas finas dan lugar a un vaciado gástrico más rápido y menos variable que las formas de dosificación sólidas. Para fármacos de alta solubilidad y permeabilidad de membrana, la tasa de vaciado controlará la tasa de absorción y el comienzo de la actividad farmacológica. Hay una relación directa entre la tasa de vaciado gástrico y la concentración máxima en plasma, y una relación inversa entre la tasa de vaciado gástrico y el tiempo requerido para alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas.

Área de superficie de absorción

El área de superficie de las diferentes regiones de tracto GI influye en la absorción. El intestino delgado tiene el área de superficie efectiva más grande para la absorción de fármacos debido a la presencia de pliegues de mucosa, vellosidades y microvellosidades. Para la absorción de fármacos mediada por transportadores, el intestino delgado es también la región más importante ya que la mayoría de estos transportadores se expresan en esta área.

Tiempo de tránsito gastro intestinal

El tiempo de tránsito GI o el tiempo de residencia medio (TRM) puede influenciar en la absorción oral de fármacos. Aumentar el TRM (o la disminución de la motilidad) da lugar a un potencial de absorción incrementado. El TRM en el estómago es de 1,3 horas mientras que en el intestino delgado es sobre 3 horas. A mayor TRM en el intestino delgado mayor será el potencial de absorción del fármaco.

Motilidad intestinal

Los movimientos intestinales se clasifican en propulsión y mezclado. El movimiento de propulsión determina el tiempo de tránsito intestinal, y es importante para formas de liberación retardada, con recubrimiento entérico que solo se libera en el intestino,

fármacos de disolución lenta y para la absorción mediada por transportadores. El movimiento de mezcla aumenta la velocidad de disolución.

Fluidos gastrointestinales

Los componentes, volumen y propiedades de los fluidos GI, especialmente el pH GI, tal y como se ha explicado en el apartado 1.2.2, afectan a la ionización, solubilidad, velocidad de disolución del fármaco y, por lo tanto, a su absorción. La velocidad de disolución de una forma de dosificación, sobre todo de comprimidos y cápsulas, depende del pH. Los fármacos ácidos se disuelven más fácilmente en medios alcalinos y tendrán una mayor disolución en los fluidos intestinales que en los gástricos. Los medicamentos básicos se disuelven más fácilmente en medio ácido y, por lo tanto, la disolución será mayor en los fluidos gástricos que en los intestinales. El pH del tracto GI depende de la salud general del individuo, enfermedades, edad, tipo de alimentación y de las terapias farmacológicas. Los fármacos anticolinérgicos y los bloqueadores H₂ aumentan el pH gástrico, disminuyendo significativamente la biodisponibilidad de algunos medicamentos débilmente básicos de solubilidad pH dependiente.

Alimentos

Los alimentos ricos en grasas pueden estimular la secreción de sales biliares, aumentando la solubilidad y disolución de ciertos fármacos, y su biodisponibilidad. Un alto contenido en proteínas puede aumentar pH gástrico, disminuyendo así la disolución de fármacos básicos débiles y su biodisponibilidad. Los alimentos ricos en calorías retardan el vaciado gástrico, retrasando la velocidad de absorción, y el inicio de la actividad farmacológica. Por otro lado, ciertos componentes de los alimentos pueden competir por la absorción de fármacos mediada por transportadores, o formar complejos con ciertos fármacos disminuyendo la absorción y biodisponibilidad, por ejemplo, las tetraciclinas forman un complejo con el calcio en la leche dificultando su absorción, algo similar ocurre con el hierro que no debe administrarse junto con lácteos.

Flujo sanguíneo

El flujo sanguíneo en el tracto GI también juega un papel importante en la absorción, se trata de un tejido altamente vascularizado que recibe el 28% del gasto cardíaco. El flujo

promueve una mayor absorción, especialmente en el transporte activo y para fármacos altamente permeables.

Edad

La edad también influye en la absorción, debido a las diferencias fisiológicas, los recién nacidos, por ejemplo, segregan menos ácido estomacal y fluidos gástricos, tienen un menor volumen de líquido intestinal, velocidad de vaciado gástrico es más lenta, tienen una superficie intestinal y un flujo sanguíneo menor, y por lo tanto tienen una absorción oral más baja.

1.2.5.2. Factores relacionados con la forma farmacéutica.

Los factores relacionados con la forma farmacéutica incluyen el uso de excipientes y distintas formas de dosificación. Los desintegrantes pueden mejorar la velocidad de disolución del fármaco y aumentar su absorción. Tensioactivos tales como Tween-80 aumentan la solubilidad y absorción de fármacos poco solubles mejorando su permeabilidad. El uso de recubrimientos entéricos en comprimidos, como el acetato de celulosa, que solo se disuelven a pH alto (> 5), protegen al fármaco de la degradación gástrica y consiguen que la absorción solo se dé a nivel intestinal. Con formas de dosificación de liberación controlada se obtienen perfiles de absorción completamente diferentes en comparación con formas de dosificación de liberación inmediata (Balimane y Chong, 2008). Esto último es importante, ya que, desde el punto de vista terapéutico, la biodisponibilidad máxima no es siempre lo más apropiado. Una absorción mayor puede asociarse a un incremento en la aparición de efectos adversos, cuando lo que realmente se pretende es conseguir niveles adecuados durante más tiempo, es decir, una biodisponibilidad optimizada o programada (Lorenzo y cols., 2017).

1.3. Clasificación Biofarmacéutica de fármacos (BCS)

El sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS), publicado por Gordon Amidon y cols. en 1995, clasifica los fármacos en función de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal, dos parámetros que tal y como se ha explicado condicionan la absorción intestinal. El sistema que contempla 4 clases, tal y como recoge la figura 18, tiene como objetivo establecer correlaciones *in vitro-in vivo* que permitan sustituir ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro*. En este contexto la FDA publicó por primera vez una guía en el año 2000 (FDA/CDER, 2000) cuyo enfoque, que llega hasta

la actualidad con una última versión en diciembre de 2017 (FDA/CDER, 2017), es utilizar esta clasificación para justificar las bioexenciones en el caso de fármacos de alta solubilidad y permeabilidad (clase 1), así como para de alta solubilidad pero de baja permeabilidad (clase 3) para formas de dosificación sólidas orales de liberación inmediata que exhiben una rápida o muy rápida disolución *in vitro* utilizando métodos analíticos recomendados y descritos. El objetivo de una bioexención es reducir la necesidad de estudios de bioequivalencia *in vivo*, es decir, proporcionar un sustituto para dichos estudios. La EMA describe (en la ICH M9 “*on biopharmaceutics classification system-based biowaivers*” EMA/CHMP/ICH/493213/2018) que dos medicamentos que contienen las mismas sustancias farmacológicas se consideran bioequivalentes si su biodisponibilidad (tasa y grado de absorción del fármaco) después de administrare a la misma dosis molar, se encuentra dentro de unos límites aceptables predefinidos. Estos límites se establecen para garantizar un rendimiento *in vivo* comparable, es decir, similitud en términos de seguridad y eficacia. En estudios de bioequivalencia *in vivo*, los parámetros farmacocinéticos fundamentales son el AUC y la C_{max} , generalmente se utilizan para evaluar la velocidad y el grado de absorción del fármaco.

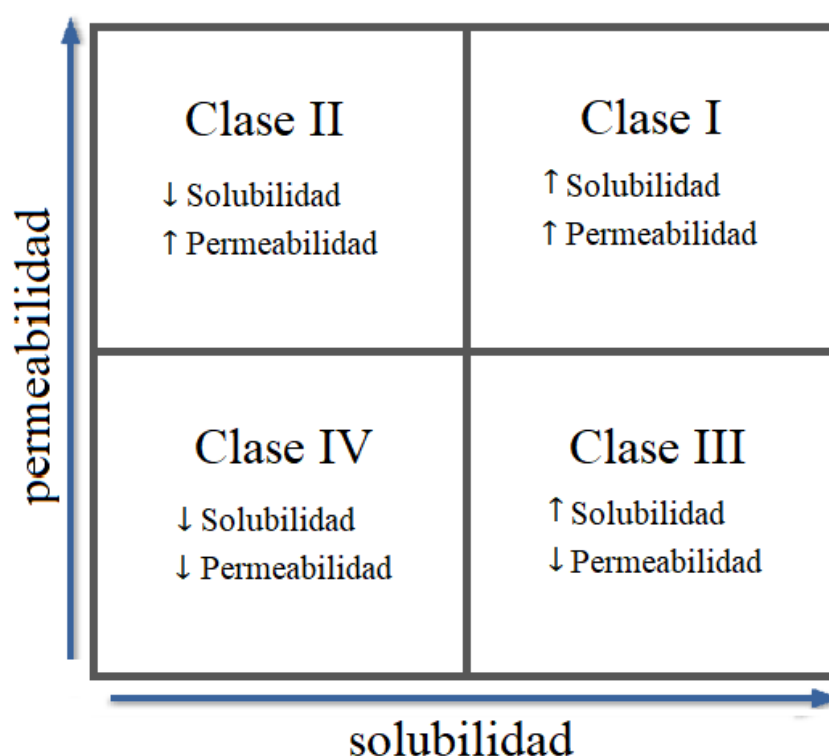


Figura 18. Clasificación biofarmacéutica de fármacos según permeabilidad intestinal y solubilidad acuosa propuesta por Gordon Amidon y cols., 1995.

La guía de la FDA (FDA/CDER, 2017) define una sustancia farmacológica como altamente soluble cuando la concentración más alta en el mercado, del medicamento de liberación inmediata para el cual se pide la bioexención, es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso dentro de un rango de pH de 1 - 6.8 a 37 ± 1 ° C. En cuanto a la velocidad de disolución según la FDA un medicamento de liberación inmediata se considera que se disuelve rápidamente cuando una media del 85 % o más de la cantidad declarada de la sustancia activa se disuelve en 30 minutos, usando el aparato 1 de disolución de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) a 100 rpm o un aparato USP 2 a 50 rpm (o a 75 rpm cuando esté debidamente justificado) en un volumen de 500 ml o menos (o 900 ml cuando se justifique debidamente) en cada uno de los siguientes medios: (1) Fluido gástrico simulado USP sin enzimas o Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N; (2) tampón de pH 4,5; y (3) tampón de pH 6,8 o fluido intestinal simulado USP sin enzimas. Cuando bajo las condiciones anteriormente citadas, una media del 85% o más de la cantidad declarada de principio activo se disuelva en 15 minutos, el medicamento de liberación inmediata se considera que se disuelve muy rápidamente.

La clasificación de permeabilidad se basa indirectamente en el grado de absorción (fracción de dosis absorbida) de la sustancia farmacológica en humanos, y directamente en mediciones de la tasa de transferencia de masa a través de la membrana intestinal humana. Pueden usarse métodos alternativos capaces de predecir el grado de absorción en humanos (p. ej., *in situ* animal, métodos *in vitro* de cultivo de células epiteliales). Un fármaco se considera altamente permeable cuando la biodisponibilidad sistémica o el grado de absorción en humanos es del 85 % o más de la dosis administrada basada en una determinación de balance de masa (con evidencia de estabilidad del fármaco en el tracto GI) o en comparación con una dosis intravenosa de referencia.

Los métodos recomendados para la determinación de la permeabilidad se analizan a continuación.

1.3.1. Estudios de permeación intestinal.

La permeabilidad de un fármaco se puede determinar mediante métodos *in vivo* en humanos como los estudios farmacocinéticos (balance de masa, o estudios de bioequivalencia absoluta) o estudios de perfusión intestinal, que son, para los organismos oficiales, los métodos preferidos. Alternativamente, se aceptan métodos que no involucran sujetos humanos, como estudios de perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* en

modelos animales (por ejemplo, rata) y otros métodos *in vitro* que utilizan cultivos celulares.

Los organismos oficiales como la FDA consideran que un solo método puede ser suficiente:

- (i) Cuando la bioequivalencia absoluta es del 85 % o más.
- (ii) Cuando 85 % o más del medicamento administrado se excreta sin cambios en orina.
- (iii) Cuando 85 % o más del medicamento administrado se recupera en orina sin metabolizar o en forma de metabolitos que evidencian la estabilidad del fármaco a lo largo del tracto GI.

Cuando un solo método falla de manera concluyente en demostrar una clasificación de permeabilidad, es aconsejable el uso de al menos dos métodos para evaluarla. En caso de obtener información contradictoria los datos humanos reemplazan los datos *in vitro* o animales.

Existen distintos métodos para evaluar la permeabilidad de un fármaco a través de una membrana. A continuación, se detallan los más importantes.

1.3.1.1. Métodos in vivo

Los estudios *in vivo* necesitan la participación de sujetos vivos de experimentación, que pueden ser animales o humanos voluntarios. Encontramos varios tipos, los estudios farmacocinéticos en humanos comprenden la mejor forma de determinar la F_a , pero la complejidad y el coste de llevar a cabo estos estudios es muy alto, ya que requieren principios activos radiomarcados para la validación de la alta recuperación de fármacos y sus metabolitos. Además, en el caso de estudios de permeabilidad en humanos debe cumplirse con las Buenas Prácticas Clínicas, con las que se garantiza la protección de los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos. En el caso de animales, también están sujetos a la aprobación por parte de comités éticos de experimentación animal.

1.3.1.1.1. Estudio farmacocinético de balance masas en humanos

Es un estudio farmacocinético completo que requiere el marcaje radioactivo del fármaco. Se realiza con voluntarios sanos y, en general, está conformado por tres fases; la primera de preparación de los voluntarios (ayuno previo al estudio), la segunda de administración

del fármaco vía oral y la tercera evaluación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco. En esta última fase se requiere la recolección de muestras de sangre, orina y heces con la finalidad de cuantificar el fármaco y sus metabolitos en todas las muestras biológicas obtenidas de cada voluntario. Este tipo de estudio suministra información valiosa sobre la biodisponibilidad del fármaco. La curva de concentración plasmática del fármaco en función del tiempo permite establecer si éste es de alta o baja permeabilidad. Para que se cumpla el balance de masas, la cantidad administrada de fármaco debe ser igual al sumatorio de las cantidades encontradas en las distintas muestras biológicas (plasma, orina y heces). (González y cols., 2015)

1.3.1.1.2. Estudio de bioequivalencia absoluta en humanos

Tras la administración oral de un medicamento, a intervalos determinados, se toman muestras de heces, tejidos o fluidos biológicos y se determina, mediante un procedimiento analítico adecuado, la cantidad de fármaco contenido en cada muestra. Este tipo de ensayos se complementa con la administración del fármaco al sujeto de estudio por vía parenteral, con el fin de obtener información sobre los valores intrínsecos del fármaco en el organismo. Por comparativa de ambos valores se obtiene la biodisponibilidad oral.

1.3.1.1.3. Estudio de perfusión intestinal en humanos

Método directo en el que la permeabilidad (cm/s) se basa en el cálculo de la absorción intestinal como función de la desaparición del fármaco en un segmento intestinal perfundido, normalmente en el yeyuno, región de absorción por excelencia de casi todos los fármacos. Hay varios métodos, método de perfusión abierta, donde se usa un tubo de triple lumen con un segmento de mezcla, en este método la incorporación de fluidos de la zona proximal puede provocar diferencias en la composición de la solución de fármaco. El método de perfusión semiabierta, donde se usa un tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal, evita la incorporación de fluidos desde el espacio proximal. El método semiabierto de tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal, con el acrónimo Loc-I-Gut, donde se minimiza la contaminación con los fluidos lumbales con el uso de un tubo multi-lumen, con un segmento de 10 cm entre dos balones. La ventaja principal del último método es que puede determinarse el metabolismo de primer paso intestinal y hepático determinando simultáneamente el grado de absorción y biodisponibilidad (González y cols., 2015). Las técnicas de perfusión en humanos tienen la desventaja de ser invasivas y podrían afectar a la fisiología, especialmente a la motilidad intestinal.

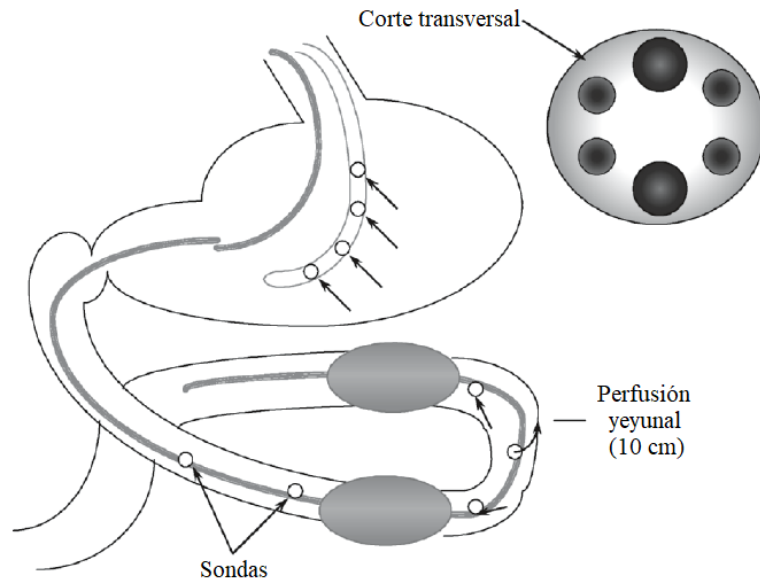


Figura 19. Esquema del método de perfusión semiabierto de tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal (Cao y Cols., 2008).

1.3.1.1.4. *Estudios de perfusión intestinal con modelos animales in vivo e in situ*

Estos estudios se realizan normalmente en animales pequeños como roedores. Uno de ellos es el método de paso único sin recirculación, en el que se perfunde el fármaco disuelto a través de un segmento del intestino canulado. El líquido colectado se analiza para obtener la concentración de fármaco y calcular su permeabilidad (Fleisher, 1995).

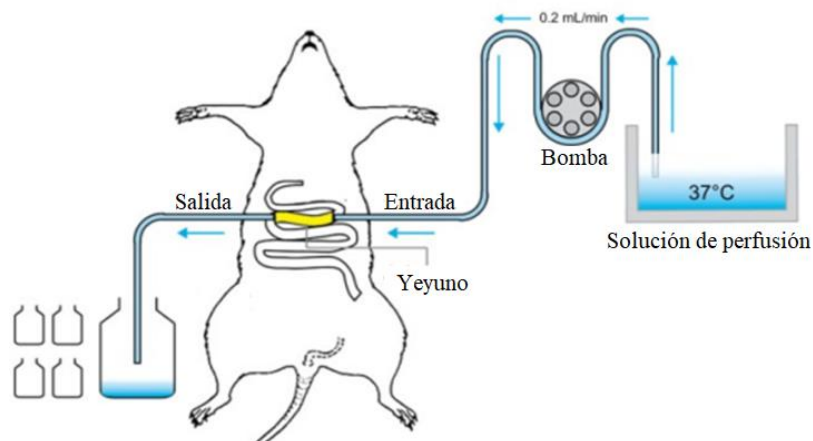


Figura 20. Esquema de perfusión intestinal *in situ* en rata para obtención de la permeabilidad. (Fleisher, 1995)

En otro método, el de Doluisio, la solución de fármaco que se permea se mantiene en la zona del intestino de la cual se toman muestras para observar la desaparición del fármaco (Doluisio y cols., 1969).

1.3.1.2. *Métodos in vitro*

El uso de métodos *in vitro* supone una serie de ventajas, comenzando con la simplificación del proceso y reducción del tiempo de aprobación requerido. Se evitan complicaciones derivadas de la experimentación en humanos y sus consideraciones éticas, además, los métodos *in vitro* suponen un coste menor.

1.3.1.2.1. *Membranas artificiales.*

Los ensayos de permeabilidad en membranas artificiales se conocen por el acrónimo PAMPA, del inglés “parallel artificial membrane permeation assay”. La membrana de permeación es un microfiltro lipofílico impregnado con una solución al 10% (m/v) de lecitina de huevo en n-dodecano. Dicha membrana se coloca entre dos placas de pocillos a modo “sándwich”. En el compartimento dador contiene una solución de concentración conocida del fármaco, mientras que el receptor contiene una solución tampón. Se utiliza mayoritariamente para calcular la permeabilidad de compuestos que se absorben por difusión pasiva transcelular (Caldwell y Yan, 2014), aunque existen numerosas variables de este método, entre ellas algunas que permiten evaluar la permeabilidad de compuestos que se absorben por difusión pasiva paracelular (Sugano y cols., 2003).

1.3.1.2.2. *Modelos celulares: Caco-2*

Existen diferentes modelos celulares en monocapa que imitan al epitelio intestinal. Estos cultivos, parten de células tumorales humanas que crecen rápidamente formando monocapas y que se diferencian de forma espontánea, proporcionando un sistema que permite llevar a cabo ensayos de permeabilidad. El modelo celular más establecido y utilizado, corresponde a la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) (Balimane y Chong, 2008).

Tras la diferenciación de las células Caco-2, éstas expresan una clara polaridad con un borde de cepillo apical, uniones intercelulares estrechas y varios transportadores activos como en el intestino delgado. Pero, debido a la baja o ausente expresión de transportadores de flujo (p. Ej., P-gp, BCRP, MRP2) o transportadores de absorción (por ejemplo, PepT1, OATP2B1, MCT1), el uso como único ensayo está reservado a los

fármacos de alta permeabilidad, según la clasificación BCS, y que se absorben por difusión pasiva (ICH M9, 2020).

Como se describe en la figura 21, el sistema consiste en un inserto que divide el pocillo en 2 compartimentos, el donante (cámara apical) y el receptor (cámara basolateral) separados por una monocapa de células que crece sobre un filtro poroso de policarbonato.

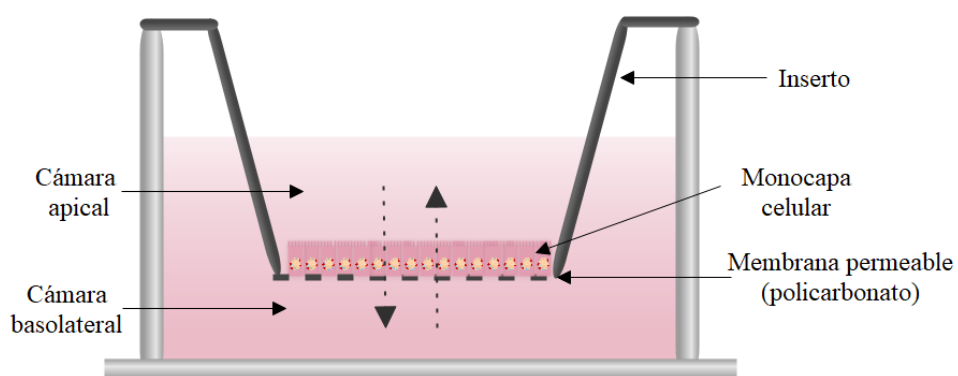


Figura 21. Esquema del sistema de permeación celular Caco-2. Editado con Edraw™
Max 9.4.

Centrándonos en la relevancia de Caco-2 en el diseño, optimización y selección de candidatos potenciales en el desarrollo de medicamentos orales, éstas se han utilizado para el estudio de mejora de la absorción oral de fármacos altamente lipofílicos y poco solubles en agua (Xue-Qing y cols., 2014), sistemas autoemulsionantes a base de lípidos (Bu y cols., 2017) y para la evaluación de nuevas formulaciones orales basadas en nanotecnología, como nanopartículas lipídicas sólidas (SLNps) (Chai y cols., 2016) o sistemas de administración de fármacos bioadhesivos, como las nanopartículas modificadas con quitosan (Dou y cols., 2019). Los ensayos con Caco-2 han sido optimizados, y aunque exhiben la variabilidad atribuible a los métodos biológicos (Markowska y cols., 2001), se conoce la importancia de emular las condiciones fisiológicas para mejorar los experimentos *in vitro*, por ejemplo, usando ácidos biliares, tensioactivos o proteínas plasmáticas, proporcionando una mejor correlación con los datos *in vivo* (Yamashita y cols., 2000).

A pesar de que es un método aceptado y establecido, tiene algunas desventajas, como su alto costo o la necesidad de personal altamente especializado, que puede ser restrictivo tanto a nivel académico como en algunos entornos del sector privado donde la optimización de los recursos es clave. El resto de las limitaciones están relacionadas con

las diferencias estructurales y funcionales entre una monocapa de células y una membrana biológica, como la intestinal. En cuanto a las ventajas que han favorecido la aceptación y uso altamente extendido, destacar que es una técnica que permite mecanizar los estudios siendo una herramienta *in vitro* de detección rápida de apoyo al descubrimiento de fármacos en la industria farmacéutica, permitiendo ordenar un gran número de compuestos en términos del potencial de absorción.

Existen otros modelos de líneas celulares utilizados, aunque en menor medida, para estudiar la permeabilidad como la línea celular MDCK del inglés “Mardin-Darby canine kidney epithelial cells”, que consiste en células polarizadas con baja expresión intrínseca de los transportadores ABC, esta línea celular presenta una ventaja frente a las células Caco-2y es que necesitan un período de cultivo más corto (3 días frente a 3 semanas), reduciendo el tiempo de trabajo y de inactividad que a su vez supone menor riesgo de contaminación celular. La línea LLC-PK1, del inglés “Pig kidney epithelial cells” con muy baja expresión intrínseca de transportadores, la línea 2/4/A1 del inglés “Rat fetal intestinal epithelial cells” que es sensible a la temperatura e ideal para los compuestos absorbidos de forma paracelular. Dentro de cada línea celular encontramos además distintos subtipos (Balimane y Chong, 2008).

2. INFLAMACIÓN

2.1. Causas y síntomas

La inflamación es una respuesta fisiológica de defensa inespecífica del cuerpo al daño tisular que forma parte de la segunda línea de defensa de nuestro sistema de inmunidad innata. Entre las condiciones que pueden producir inflamación se encuentran los patógenos, abrasivos, irritantes químicos, distorsión o alteración de células, traumas y temperaturas extremas (Tortora y Derrickson, 2010). El objetivo de esta respuesta no será otro que reclutar, en el sitio de la lesión, elementos humorales y celulares de la inmunidad con el fin de erradicar rápidamente el agente infeccioso, toxinas o sustancias extrañas a fin de prevenir su diseminación a otros tejidos, para preparar el sitio para la reparación tisular y restaurar la homeostasis (Fainboim y Geffner, 2011)

Los signos clínicos asociados a la inflamación se resumen usando el acrónimo DRIEC:

- D dolor debido a la liberación de ciertas sustancias químicas.
- R (rojo) enrojecimiento debido al mayor flujo de sangre hacia el área afectada.
- I inmovilidad por pérdida de función en inflamaciones graves.
- E edema causado por acumulación de líquidos.
- C calor debido al mayor flujo de sangre hacia el área afectada.

Estos signos clásicos de la inflamación ya fueron descritos por Cornelius Celsus en el siglo I de nuestra era, que nos regaló una definición clínica de la inflamación, como un proceso con signos mayores *rubor et tumor cum calore et dolore* (rubor y tumor, con calor y dolor) (Andrade y cols., 2016).

Es un proceso mediado por varios tipos de mediadores celulares solubles y células presentes o reclutadas en el foco del daño. Las principales células que producen estos mediadores son plaquetas, neutrófilos, monocitos/macrófagos y mastocitos, pero células como fibroblastos-endoteliales de músculo liso también pueden activarse y producirlos. Mediadores plasmáticos como las proteínas del complemento, las cininas y proteínas de fibrinólisis se producen principalmente en el hígado y están presentes en la circulación como precursores inactivos que necesitan ser activados generalmente por una serie de divisiones proteolíticas (Riccardi y cols., 2018).

El proceso que puede resumirse en 3 etapas, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, migración (movimiento) de fagocitos desde la sangre hacia el líquido intersticial y reparación tisular, comienza con la liberación de mediadores de la inflamación preexistentes en los mastocitos como la histamina y la serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT), ambas aminas vasoactivas que dan lugar a vasodilatación, dolor y edema por aumento en la permeabilidad vascular (Riccardi y cols., 2018). La serotonina al liberarse tendría efecto sobre los macrófagos/monocitos y daría lugar a un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias como la Interleucina 1 (IL-1) y la Interleucina 6 (IL-6) (Dürk y cols., 2005). Otros mediadores preformados que se liberan por la degranulación de los mastocitos son quimiocinas, enzimas y proteasas. Entre las quimiocinas se encuentra la IL-8 responsable de infiltración leucocitaria en los tejidos. En cuanto a las enzimas encontramos kinogenasas que dan lugar a la síntesis de cininas vasodilatadoras y la fosfolipasa, enzima que promueven la síntesis de ácido araquidónico activando la cascada de síntesis de la familia de eicosanoides (Theoharides y cols., 2012).

Dentro de la familia de eicosanoides, palabra con raíz Griega, εἴκοσι (eikosi) que significa veinte, ya que son mediadores lipídicos bioactivos con 20 átomos de carbono, encontramos 4 tipos en función de la ruta de síntesis a partir del AA. Los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), obtenidos por la vía del Citocromo P450; los isoprostanos, obtenidos por vías no enzimáticas; leucotrienos y lipoxinas, sintetizados vía Lipooxigenasas (LOX) y los prostanoides sintetizados vía ciclooxigenasas (COX) (Riccardi y cols., 2018).

La síntesis de prostanoides por la vía de las COX se lleva a cabo por 2 isoformas que han sido caracterizadas de esta enzima, la COX constitutiva (COX-1), que se expresa en la mayoría de los tejidos de mamíferos, y la COX inducible (COX-2) (Kargman y cols., 1996). Ambos catalizan la oxidación de AA a prostaglandina G₂ (PGG₂), que conduce a la prostaglandina H₂ (PGH₂) por la acción de la peroxidasa, luego las prostaglandinas sintetasas específicas de tejido conducen a todas las diferentes prostaglandinas, prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F₂ (PGF₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina (PGI₂) y tromboxano A₂ (TXA₂) (Fitzpatrick, 2004). El proceso se esquematiza en la figura 22.

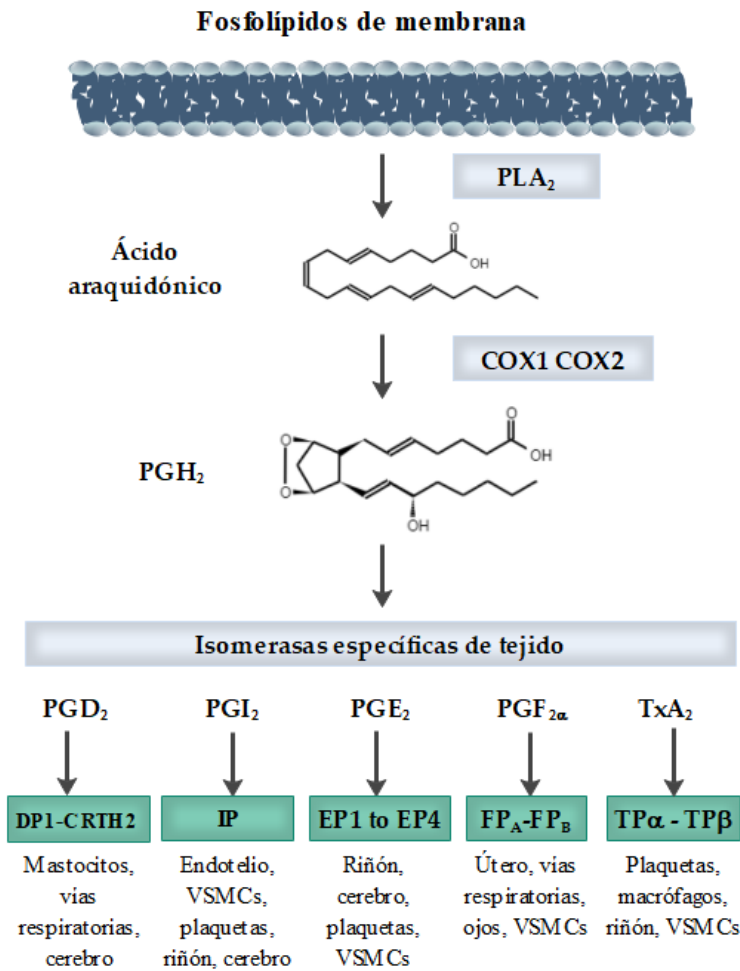


Figura 22. Esquema de síntesis de prostaglandinas a partir de fosfolípidos de membrana, incluidas enzimas, sustratos y receptores. PLA₂ (fosfolipasa A₂); COX1 (ciclooxigenasa 1); COX2 (ciclooxigenasa 2); PGH₂ (prostaglandina H₂); PGD₂ (prostaglandina D₂); DP1 y CRTH2 (DP₂) (receptores D-prostanoides); PGI₂ (prostaciclina); IP (receptor de prostaciclina); PGE₂ (prostaglandina E₂); EP1 a EP4 (receptores de prostaglandinas); PGF_{2α} (prostaglandina F_{2α}); FPA y FPB (receptores prostanoides, isoformas A y B); VSMCs (Células vasculares del músculo liso); TxA₂ (tromboxano A₂); y TPα y TPβ (receptores prostanoides de tromboxano). Figura editada con EdrawTMMMax 9.4

Los eicosanoides son críticos para generar, mantener y mediar en la respuesta inflamatoria, aunque también tienen funciones homeostáticas y roles importantes en la fisiología cardiovascular y reproductiva entre otros. (Riccardi y cols., 2018). Clásicamente se asoció la expresión de COX-2, con eventos proinflamatorios y dolorosos (Fitzpatrick, 2004; Singer y cols., 1998). Xie y cols. fueron los primeros en demostrar que la expresión del gen de la COX-2 se induce en condiciones de inflamación (Xie y cols.

1991), mientras que la COX-1 fue descrita como un protector de la mucosa gástrica, entre otros tejidos, ya que años atrás varios autores habían descrito que las prostaglandinas PGE₂ tenían efectos citoprotectores (Robert y cols., 1979), antiulcerosos (Wilson y cols., 1971; Main y Whittle, 1973) y se encontró que la síntesis de PGE₂ estaba más relacionado con la COX-1 que con COX-2 (Jackson y cols., 2000). La PGI₂ también se describió como un potente inhibidor *in vivo* de la secreción de ácido gástrico y potenciador del flujo sanguíneo de la mucosa cuando se infunde por vía intravenosa (Whittle y cols., 1978).

A mediados de los 90, Langenbach y cols. reportó que la inhibición de COX-1 no causaba daño gástrico espontáneo (Langenbach y cols., 1995; Langenbach y cols., 2002), y algunos años después, nuevos hallazgos asociaron la expresión del gen COX-2 a la cicatrización de heridas en enterocitos a través de p38 activado por mitógeno proteínas quinasas (p38 MAPK) (Karrasch y cols., 2006) evidenciando que el concepto de asignación funciones homeostáticas y patológicas a la COX-1 y COX-2 respectivamente, era un enfoque demasiado plano o sencillo, y no reflejaba la realidad de ambas enzimas.

Otro mediador de la inflamación es el Factor activador de plaquetas (PAF) (1-0-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosforilcolina) fosfolípido autocoide que se segrega al inicio de la respuesta inflamatoria, y es reconocido por un receptor de la familia de la rodopsina, receptor acoplado a proteína G (PAFR) con siete dominios transmembrana. Este receptor presente en numerosos tejidos y órganos como riñones, intestino delgado, pulmones, cerebro e hígado no es un receptor específico de PAF, ya que también reconoce y se une a la Fosfatidilcolina oxidada (PAF-LL) y a compuestos de la membrana bacteriana, como el lipopolisacárido (LPS). Cabe destacar que tiene baja expresión en el músculo esquelético, estómago, corazón y páncreas. La activación de PAFR, da lugar a que la Fosfolipasa C (PLC β) medie la hidrólisis de Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para producir inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), que conduce a una elevación transitoria de Ca²⁺ citosólico y a la activación de la proteína Kinasa C (PKC). El aumento del Ca²⁺ citoplasmático también activa PLA₂ que puede conducir la síntesis de más PAF y de eicosanoides. Todo el proceso conduce a un aumento de la permeabilidad vascular, adhesión e infiltración de leucocitos, y también es responsable de la estimulación de la contracción uterina (Riccardi y cols., 2018).

Otro importante grupo de mediadores celulares de la inflamación y la respuesta inmune son las citocinas, polipéptidos producidos por varios tipos de células en respuesta a

diferentes estímulos externos. Hay diferentes tipos de citocinas, incluidas las interleucinas, y factor de necrosis tumoral (TNF), intervienen directamente en el proceso inflamatorio; un tercer tipo de citocinas, los interferones, son una familia de agentes antivirales de amplio espectro, descubiertos por el fenómeno de interferencia viral en el que un animal infectado por un virus resiste la sobreinfección por un segundo virus no relacionado. (Riccardi y cols., 2018).

Las citocinas se caracterizan por ser proteínas de bajo peso molecular (15-25 kDa) secretadas de forma transitoria y estrictamente asociada a la presencia de material extraño o como respuesta a señales endógenas de daño. Es importante que sean moléculas que puedan degradarse de forma rápida asegurando a su vez una disminución rápida en ausencia de los estímulos mencionados. Al contrario que las hormonas endocrinas, la mayoría de las citocinas actúan de forma local, de una forma paracrina o incluso autocrina (Delves y cols., 2014).

Las interleucinas se clasifican como tal por ser proteínas que ejercen efectos funcionales sobre los leucocitos. Se han descrito alrededor de 34 interleucinas (IL-1 a la IL-35) con numerosas funciones efectoras proinflamatorias como inducción de quimiocinas, de células T y B activadas, crecimiento de mastocitos, estimulación de otras citocinas, entre otras (Delves y cols., 2014).

El papel principal del TNF es de defensa con una función importante en la respuesta ante infecciones, aunque una producción excesiva puede ser peligrosa, ya que tiene efectos sobre el endotelio vascular, aumenta la permeabilidad vascular e induce la expresión de proteínas procoagulantes que pueden causar eventos trombogénicos intravasculares, también interacciona con los leucocitos endoteliales, induce la expresión de la COX-2, dando lugar a vasodilatación, calor y rubor (Riccardi y cols., 2018).

Un tipo de citocinas quimiotácticas, las quimiocinas controlan la migración y residencia de todas las células inmunes en los tejidos. Tienen funciones homeostáticas para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos, controlan respuestas de inmunidad innata y adaptativa y en el contexto de la inflamación, su función principal es guiar a los leucocitos durante su reclutamiento al foco inflamatorio (Riccardi y cols., 2018).

Por último, un tipo de proteínas plasmáticas mediadoras de la inflamación, el sistema del complemento. Éste tiene un papel fundamental en la respuesta innata al reconocer señales

de peligro endógenas, también contribuye a la eliminación de patógenos invasores actuando de puente entre la inmunidad innata y adaptativa; en cuanto al control de la respuesta inflamatoria se une a los complejos inmunes y células apoptóticas, ayudando a su eliminación en el foco inflamatorio (Riccardi y cols., 2018).

2.2. Estrés oxidativo en inflamación

Las células eucariotas utilizan la oxidación de nutrientes como fuente de energía para obtener ATP. El proceso completo de oxidación de la glucosa por parte de la célula involucra varias vías metabólicas como la glucólisis, el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (CTE), además de varios compartimentos celulares, como el citoplasma, membrana y matriz mitocondrial. En la CTE, los electrones de la Nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH) son transportados secuencialmente por una serie de reacciones redox a través del complejo I, ubiquinona, complejo III citocromo c, hasta el complejo IV, donde en una reacción catalizada por la citocromo-oxidasa, los electrones y el oxígeno molecular dan lugar a la formación de agua. Por lo tanto, el papel principal del oxígeno para todos los organismos aeróbicos es actuar como aceptor final de electrones (Cadenas y Davies, 2000).

En condiciones fisiológicas y como consecuencia del metabolismo, enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH), succinato deshidrogenasa (SDH), ubiquinona, citocromo c reductasa, citocromo b5, monoamino oxidasas (MAO-A y MAO-B), aconitasa mitocondrial, complejo deshidrogenasa α -cetoglutarato (KGDHC), dihidroorotato deshidrogenasa (DHOH), complejo de piruvato deshidrogenasa (PGDH), complejo de oxoglutarato deshidrogenasa (OGDC), son responsables de una producción endógena constante de radicales libres (RL) como especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNI) (Moniczewski y cols., 2015). Estos intermedios que interactúan como moléculas de señalización para el metabolismo, el ciclo celular y las vías de transducción intracelular (Nathan, C, 2003), también se producen en respuesta a la exposición a agentes exógenos como los rayos UV, la radiación ionizante o la contaminación del aire (Halliwell, B, 1991). La principal fuente de generación de ROS es la CTE mitocondrial, sin embargo, también hay fuentes no mitocondriales de moléculas reactivas y RL que incluyen diversas oxidasas-reductasas que catalizan reacciones de transferencia electrones, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la LOX y el

Citocromo microsomal P450 (Moniczewski y cols., 2015). Como consecuencia del metabolismo de purinas en el citoplasma, llevado a cabo por la xantina oxidasa (XO), se producen otros potentes ROS (Kelley y cols., 2010).

Un RL es un átomo o molécula con un electrón no apareado en la órbita externa, lo que lo hace altamente inestable y reactivo. Estas especies se estabilizan capturando el electrón necesario de biomoléculas cercanas (Mc Cord, 2000). Cuando estas especies no son eliminadas por los antioxidantes, o se producen en exceso, aparece el denominado estrés oxidativo, proceso en el que hay un desequilibrio bioquímico entre RL y antioxidantes (Hartman y cols., 2013).

Las implicaciones para la homeostasis del estrés oxidativo incluyen el daño a las proteínas, los lípidos, el ADN y estructuras celulares, y está directamente vinculado a inflamación ya que, como se ha explicado, las células inflamatorias secretan una gran cantidad de citocinas y quimiocinas responsables de la producción de RL en células fagocíticas y no fagocíticas a través de la activación de señalización de proteínas quinasas (Federico y cols., 2007). Concretamente, los RL estimulan la activación de un tipo importante de receptor de membrana, el receptor tipo toll 4 (TLR-4), que da lugar a la producción de moléculas de señalización mediadoras como factor de transcripción factor nuclear kappa-B (NF- κ B) (Baird y Dinkova-Kostova, 2011), este receptor está relacionado con el estrés oxidativo y la inflamación, y su regulación es el mecanismo de acción de ciertas moléculas antioxidantes que han demostrado inhibir el proceso inflamatorio (Aderem y Ulevitch, 2000; Medzhitov, 2001). Al activarse NF- κ B, da lugar a la síntesis de IL-1 β o del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Naik y Dixit, 2011) y otros mediadores, como la iNOS o la COX-2 (Lee y cols., 2004).

Sobre el daño en los lípidos celulares, se ha visto daño sobre productos de peroxidación lipídica y aldehídos derivados de lípidos como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y acroleína, la cual está implicada en numerosas enfermedades inflamatorias inducidas por el estrés oxidativo con efectos nocivos (Yadav y Ramana, 2013). En cuanto a las proteínas y el ADN el daño puede causar mutaciones y está implicado en el inicio y/o promoción de la carcinogénesis mediada por inflamación (Ohnishi y cols., 2013).

Los ROS y la inflamación han sido identificados en la patogénesis y el desarrollo de una gran cantidad de enfermedades no relacionadas, incluido el cáncer (Reuter y cols. 2010);

enfermedades del sistema nervioso, como trastornos psiquiátricos (Smaga y cols. 2015), Alzheimer (Simoncini y cols., 2015), Parkinson (Golpich y cols., 2008) y lesión cerebral traumática (Ansari y cols., 2008), enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis (Hawa y cols., 2015), enfermedades metabólicas como diabetes mellitus II (Pickup, 2004), enfermedad periodontal (D' Aiuto y cols., 2010), enfermedad renal crónica (Tucker y cols., 2015), enfermedades autoinmunes GI (Colitis ulcerosa y Crohn) (Piechota-Polanczyk y Fichna, 2014), otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Mahad y cols., 2015), reumatoide artritis (Park y cols., 2014), enfermedades hepáticas (Balasubramanian, 2015) y otras como fibromialgia (Sánchez-Domínguez y cols., 2015).

El óxido nítrico (NO) es un híbrido entre nitrógeno molecular y oxígeno y normalmente es menos reactivo que el oxígeno, ya que NO tiene un solo electrón no apareado. El NO es considerado una molécula mensajera biológica y participa en diversos procesos biológicos, incluidos vasodilatación, broncodilatación, neurotransmisión, vigilancia tumoral, inhibidor de plaquetas agregación, defensa antimicrobiana y regulación de respuesta inflamatoria-inmune. La síntesis de NO ocurre por la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina, mediado por una familia de isoformas conocidas como nítrico óxido sintasas (iNOS) (Riccardi y cols., 2018).

La inflamación puede clasificarse en aguda o crónica según un número de factores. En la inflamación aguda, los signos y síntomas se desarrollan rápidamente y suelen durar pocos días o semanas. Es leve y autolimitada, y las principales células defensivas son los neutrófilos. Algunos ejemplos de inflamación aguda son la faringitis, apendicitis, un traumatismo o un rasguño en la piel. Se sabe por ejemplo que desequilibrios en la síntesis de eicosanoides pueden dar lugar a funciones anormales que conducen a procesos inflamatorios crónicos (Tessaro y cols., 2015). Una respuesta inflamatoria no controlada provoca daño extenso en células y tejidos, dando lugar a su destrucción, lo que también se asociada con la inflamación y diversas enfermedades crónicas (Babatunji y cols., 2015). En la inflamación crónica, los signos y síntomas se desarrollan más lentamente y pueden durar hasta varios meses o años. Suele ser grave y progresiva, y las principales células involucradas son los monocitos y macrófagos. Las enfermedades inflamatorias crónicas más comunes son la artritis reumatoidea, colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias intestinales. (Tortora y Derrickson, 2010).

Las acciones proinflamatorias de muchos eicosanoides producidos en la fase inicial del proceso de inflamación hacen que la inhibición de su vía de síntesis sea, tal y como veremos en los datos del apartado 3.2, la estrategia predominante en la clínica del manejo de la inflamación, el dolor o la fiebre.

3. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

3.1. Introducción.

Los antiinflamatorios se clasifican en dos grandes grupos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides). Los esteroideos son corticosteroides naturales (hormonas producidas por la corteza suprarrenal) o semisintéticos con características estructurales y farmacológicas similares a los naturales, aunque generalmente más potentes; los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los glucocorticoides dependen de varios mecanismos moleculares, se pueden definir tres mecanismos de acción diferentes, efectos directos sobre la expresión génica mediante la unión de los receptores de glucocorticoides a elementos sensibles a los glucocorticoides (es decir, la inducción de anexina I y fosfatasa 1 de MAPK), efectos indirectos sobre la expresión génica a través de las interacciones de los receptores de glucocorticoides con otros factores de transcripción (NF- κ B y la proteína activadora 1), y los efectos mediados por el receptor de glucocorticoides en las cascadas de segundo mensajero (vía PI3K-Akt-eNOS) (Rhen y Cidlowski, 2005). Los AINE son un grupo químicamente muy heterogéneo que inhibe la endoperóxido-H sintasa 1 y 2 (PGHS), también conocida como COX, COX-1 y COX-2, y con ello la síntesis de prostaglandinas (Wongrakpanich y cols., 2018), aunque como se describe en la sección 1.3 su mecanismo de acción y los daños GI derivados no tienen un enfoque tan simplificado.

El origen de los antiinflamatorios se remonta al uso de extractos de corteza de sauce (*Salix alba* y otras especies *Salix*) que contenían salicilatos para el tratamiento de episodios inflamatorios y de dolor. Las primeras evidencias del uso de la corteza de sauce son del 400 a.C. en la época de Hipócrates. Fue ya en siglo XIX cuando hubo un enorme aumento en el interés y desarrollo terapéutico de los salicilatos (Rainsford and Path, 1984).

Hubo dos períodos importantes en el descubrimiento de fármacos AINE después de La Segunda Guerra Mundial, el período hasta la década de 1970, que fue el período anterior a las prostaglandinas y a partir de entonces hasta la última parte del siglo pasado en el que el efecto de los AINE en la síntesis de prostaglandinas formó parte del cribado en el proceso de desarrollo de diferentes fármacos. Los medicamentos desarrollados hasta la década de 1980-finales de los 90 se descubrieron en gran medida empíricamente a través

de la detección de actividades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas en modelos de animal de laboratorio. En la década de 1990 se hace un importante descubrimiento en el campo de la biología celular y molecular sobre la enzima endoperóxido-H sintasa o COX, sistema enzimático que controlan la síntesis de prostanoïdes en el organismo; y tal como se explica en la sección de inflamación, se descubre y se caracterizan dos isoformas de la COX, COX-1 y COX-2, y se relaciona cada una de ellas con diferentes prostanoïdes (Harris, 2007; Kargman y cols., 1996)

En la actualidad los AINE suponen un grupo de medicamentos de los más consumidos a nivel global, siendo la piedra angular del manejo del dolor tanto en pacientes que tienen dolor inflamatorio agudo (por ejemplo, dolor de cabeza, dolor postoperatorio y fracturas ortopédicas), como dolor crónico (p. ej., artritis reumatoide, osteoartritis y gota) (Castellsague y cols., 2012; McCarberg y Gibofsky, 2012). A continuación, se revisan los datos de mercado y uso a nivel global de estos medicamentos.

3.2. Datos de mercado y uso a nivel global.

El mercado más importante de AINE por regiones se localiza en Europa y el Sudeste Asiático, que concentraron entre septiembre de 2018 y septiembre de 2019 el 59,80% del total tal y como se muestra en la Figura 23.

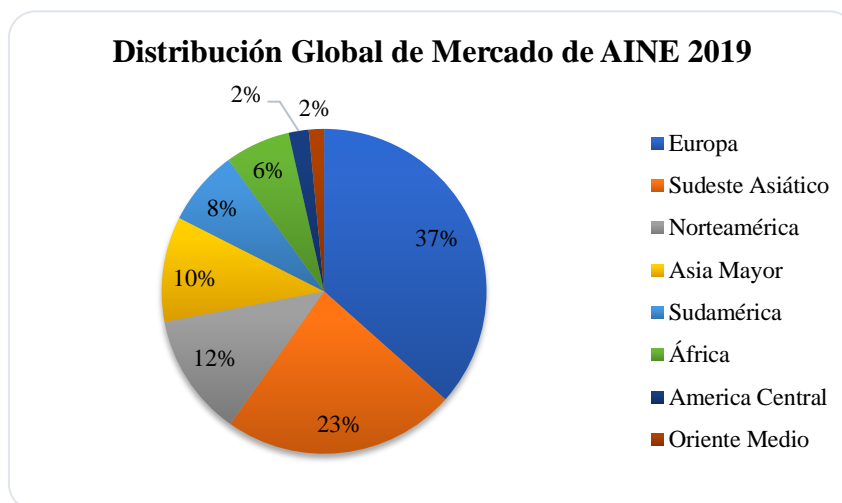


Figura 23. Distribución porcentual del mercado mundial de antiinflamatorios no esteroïdeos (AINE) de septiembre 2018 a septiembre 2019. Fuente IQVIA®.

Tal y como muestra la tabla 1 desde septiembre de 2018 a septiembre de 2019 se vendieron 179.000 millones de unidades estándar o dosis (comprimidos, cápsulas, sobres,

etc.) en todo el mundo. Solo en Europa más de 65.000 millones, lo que nos da una idea de la dimensión en el consumo de este tipo de fármacos. Según los últimos datos publicados por la ONU, se estima que en 2018 el continente Europeo tenía unos 746 millones de habitantes (ONU, 2019), lo que da lugar a un consumo medio de 88 dosis al año por habitante de AINE. La media desciende en el sudeste asiático a 64 dosis por habitante y año, donde se estima viven unos 655,3 millones de habitantes y a 60 en el caso de Norteamérica con 364,3 millones de habitantes. Si extrapolamos los datos a nivel global, hablamos de un consumo medio de 24 dosis por habitante y año.

Continente	2016	2017	2018	2019
Europa	64.741.648.101	65.938.122.713	66.362.647.241	65.707.862.376
Sudeste Asiático	40.014.300.315	39.589.174.735	41.934.755.237	41.712.775.786
Norteamérica	23.631.184.985	22.848.367.054	22.416.594.031	21.867.899.583
Asia Mayor	18.887.406.066	19.023.188.095	19.196.114.581	18.826.796.686
Sudamérica	13.351.825.143	13.695.484.289	13.747.327.090	13.524.059.989
África	10.766.511.307	10.796.862.832	11.089.913.905	11.681.330.284
América Central	3.434.578.451	3.595.460.582	3.581.320.966	3.577.537.963
Oriente Medio	2.678.358.955	2.550.322.532	3.269.871.562	2.720.069.914
Total	177.505.813.323	178.036.982.832	181.598.544.613	179.618.332.581

Tabla 1. Datos del mercado mundial de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) por región y expresado en unidades estándar. Años expresados desde septiembre a septiembre. Fuente IQVIA®

La tendencia de evolución del mercado de AINE (tabla 1 y figura 24), en todas las regiones del mundo, o bien es de mantenimiento o bien de incremento.

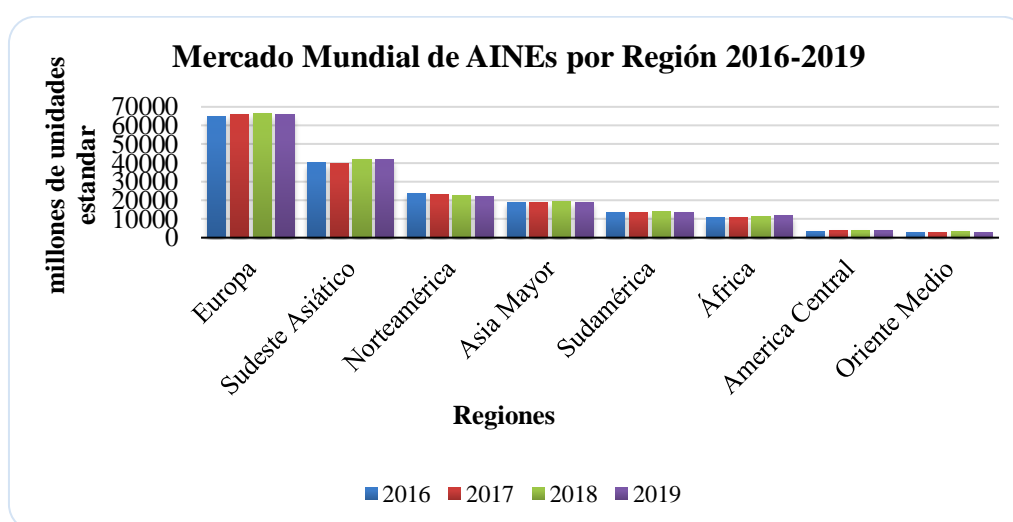


Figura 24. Gráfica del mercado mundial de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y expresado en millones de unidades estándar. Años expresados desde septiembre a septiembre del año siguiente. Fuente IQVIA®.

Centrándonos en las moléculas más importantes, tal y como muestra la tabla 2 y la figura 25 las 4 moléculas más importantes son Ácido acetil salicílico (AAS) que alcanza casi los 40.000 millones de dosis, seguido de Ibuprofeno (IB) con más de 31.000 millones, Diclofenaco sódico (DIC) con 29.390 millones y Ketoprofeno (KET) con 7.100 millones de unidades estándar o dosis.

Molécula	2016	2017	2018	2019
Ácido acetil salicílico	40.256.992.342	40.169.632.129	40.404.224.070	39.273.625.778
Ibuprofeno	30.788.335.354	31.097.099.731	31.435.561.876	31.243.034.798
Diclofenaco	29.116.136.275	29.255.132.480	30.090.984.551	29.390.392.364
Ketoprofeno	7.269.950.168	7.147.708.977	7.120.971.281	7.100.002.591

Tabla 2. Datos de las principales moléculas de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) vendidos a nivel global. expresado en unidades estándar. Años expresados desde septiembre a septiembre del año siguiente. Fuente IQVIA®.

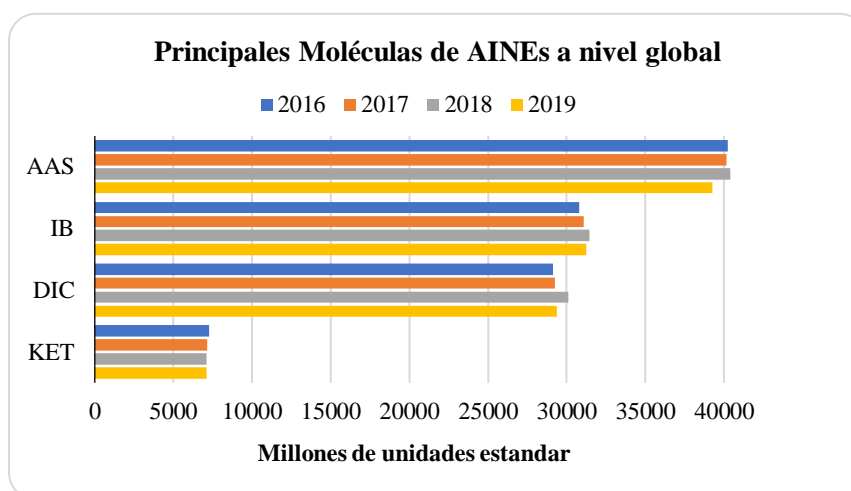


Figura 25. Gráfica de las principales moléculas de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) vendidos a nivel global, expresado en millones de unidades estándar. Años expresados desde septiembre a septiembre. Fuente IQVIA®. Abreviaturas: AAS (ácido acetil salicílico); IB (Ibuprofeno); DIC (Diclofenaco sódico); KET (Ketoprofeno).

En Europa las tres más vendidas son AAS, DIC e IB excediendo los 12.000 millones de unidades estándar que en el caso del AAS sobrepasa los 16.000 millones. La cuarta posición es para el Ketoprofeno (KET) que casi alcanza los 3000 millones de unidades

estándar. Por lo que las áreas terapéuticas principales estarían relacionadas con el dolor, inflamación, fiebre y la profilaxis de eventos cerebrovasculares isquémicos no mortales, en los que ha demostrado eficacia el AAS (Abdelaziz, H. K., 2020)

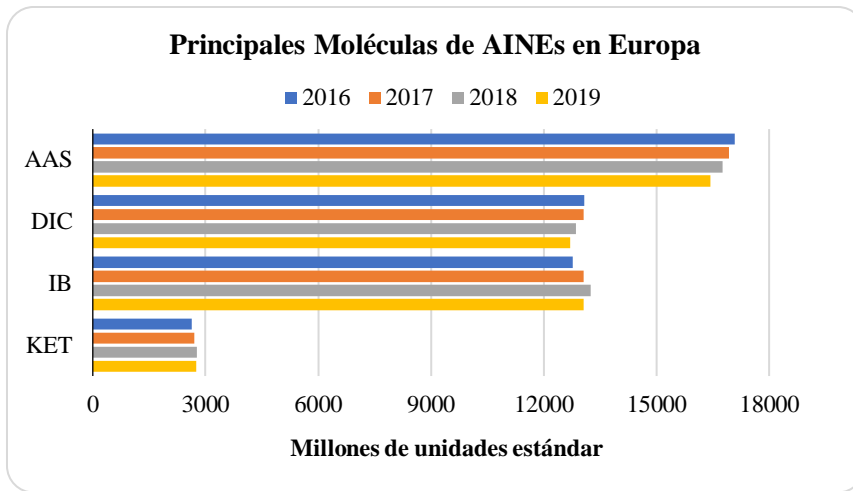


Figura 26. Gráfica de las principales moléculas de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en Europa, expresado en millones de unidades estándar. Años expresados desde septiembre a septiembre. Fuente IQVIA®. Abreviaturas: AAS (ácido acetil salicílico); DIC (Diclofenaco sódico); IB (Ibuprofeno); KET (Ketoprofeno).

En el Sudeste Asiático, según muestra la figura 27, las cifras de las 4 moléculas principales son algo más bajas. DIC y AAS con más de 4.800 millones de ventas cada uno seguidos por 3.900 y 3.800 millones para la combinación de IB-PCT e IB respectivamente. Las áreas terapéuticas principales serían las mismas que en Europa: dolor, inflamación, fiebre y profilaxis de eventos cerebrovasculares en caso del AAS.

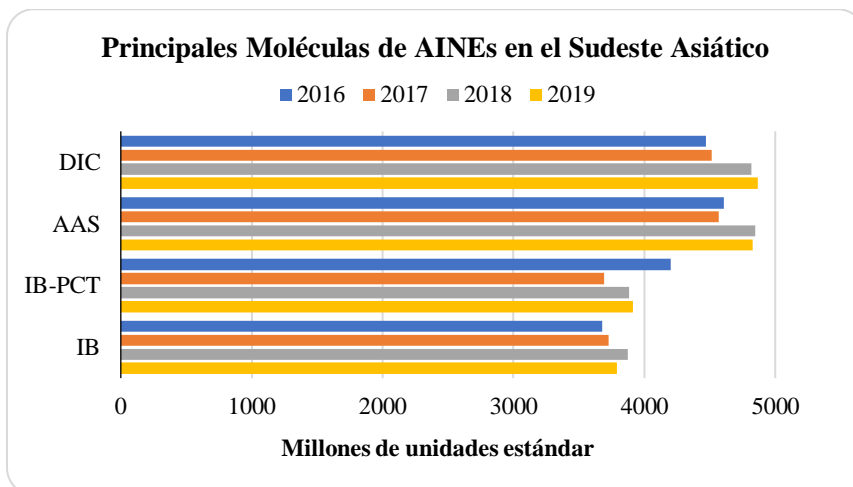


Figura 27. Gráfica de las principales moléculas de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en el Sudeste Asiático, expresado en millones de unidades estándar. Años expresados desde septiembre a septiembre. Fuente IQVIA®. Abreviaturas: DIC (Diclofenaco sódico); AAS (ácido acetil salicílico); IB-PCT (Ibuprofeno-Paracetamol); IB (Ibuprofeno).

En cuanto a las vías de administración, para los principales AINE consumidos en todo el mundo (considerando todas las regiones) que son AAS, IB y DIC, las formas orales son mayoritarias (aproximadamente 80,2%), seguidas de las tópicas (17,2%) y parenterales (1,2%). Aunque la distribución es diferente según el AINE, por ejemplo, AAS e IB se administran principalmente por vía oral, mientras que el DIC se administra por vía oral y tópica en proporciones similares. Todos los datos se resumen en la tabla 3.

Vía de administración	Diclofenaco	Ácido acetilsalicílico	Ibuprofeno	% del Total
Oral	12.040.197.956	39.261.606.505	28.871.366.766	80,2
Tópica	14.861.079.649	2.264.060	2.368.457.056	17,2
Parenteral	826.817.759	9.733.575	2.047.112	1,2
Oftálmica	1.163.001.557	0	0	0,8
Otras	499.278.551	21.295	616.646	0,5
Total	29.390.375.472	39.273.625.435	31.242.487.580	100

Tabla 3. Distribución de las diferentes vías de administración para el ácido acetilsalicílico, diclofenaco e ibuprofeno, los tres principales medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) consumidos en todo el mundo. Los datos se refieren a 2019 y se expresan en unidades estándar. Fuente IQVIA®.

3.3. Mecanismo de acción de los Antiinflamatorios no esteroideos, daño gastrointestinal y su impacto económico.

Tal y como recoge el apartado de inflamación, los eicosanoides son críticos para generar, mantener y mediar en la respuesta inflamatoria, por ello la inhibición de la actividad de las enzimas COX son el objetivo de los AINE, que es un conjunto heterogéneo de fármacos que contienen distintos grupos funcionales, como los ácidos arilacéticos yilacéticos, ácidos arilpropiónicos, cetoenoles y heterociclo diarílicos (Lanas, 2016) (Duggan y cols., 2010).

Cabe destacar la gran diversidad de mecanismos de unión a la COX-1 y COX-2 de los diferentes AINE. La habilidad de las enzimas COX para acomodar inhibidores estructuralmente distintos es particularmente notable porque no hay evidencia de cambios

considerables en las conformaciones de proteínas en sus interacciones con varios AINE (Blobaum y cols., 2007).

En cuanto al daño GI producido por los AINE sea cual sea su vía de administración, durante años fue ampliamente aceptado que la causa principal era la inhibición de la vía de la COX-1, de hecho, esto desencadenó la investigación y desarrollo de inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIBS) (Masferrer y cols., 1996). Los inhibidores selectivos de COX-2 parecían tener un perfil GI más seguro que los AINE clásicos, pero con el tiempo se demostró un mayor riesgo de efectos secundarios cardiovasculares, lo que redujo considerablemente el balance beneficio-riesgo de este grupo de medicamentos (Kearney y cols., 2006; McGettigan y Henry, 2006). Estos efectos cardiovasculares se explican, entre otras razones, debido al papel clave de la COX-2 en la síntesis de PGI₂ que es un protector vascular importante con actividad como vasodilatador, antitrombótico, y propiedades antiagregantes y antiinflamatorias (Majed y Khalil, 2012).

Tal y como se explica en la sección 2.1 el concepto de asignación funciones homeostáticas y patológicas a la COX-1 y COX-2 respectivamente, es un enfoque demasiado plano o simplificado. Ya se demostró que la inhibición de COX-1 no causa daño gástrico espontáneo (Langenbach y cols., 1995; Langenbach y cols., 2002) y que la COX-2 tiene un papel en la cicatrización de heridas en los enterocitos a través de p38 activado por mitógeno proteínas quinasas (p38 MAPK) (Karrasch y cols., 2006).

Actualmente, hay evidencias de la participación de múltiples vías celulares en el daño GI mediado por los AINE. La secuencia concreta es desconocida, pero podría iniciarse por la alteración de la capa protectora de moco gástrico (Kato y cols., 2000) como resultado de la interacción de los AINE con fosfolípidos (PL) como la fosfatidilcolina (PC) (Lichtenberger y cols., 1995; Lichtenberger y cols., 2012) el componente principal de la capa de moco gástrico y de la mucosa (Bernhard y cols., 1995). Los estudios demostraron que los AINE tienen una fuerte afinidad para formar asociaciones iónicas e hidrófobas, no covalentes y reversibles con los PL (específicamente con la PC) (Lichtenberger y cols., 2012). La interacción directa entre los AINE y la PL junto con la disminución de la secreción de moco por inhibición de la síntesis de PGE₂ también mediada por los fármacos antiinflamatorios (Scheiman y Hindley, 2010) puede provocar cambios en la fluidez, permeabilidad y en las propiedades biomecánicas de la membrana celular del epitelio gástrico. La invasión de la mucosa intestinal por las enterobacterias sería

responsable de la respuesta inmune, incluida la adherencia y la infiltración de leucocitos (neutrófilos), cuando el lipopolisacárido (LPS) y otras endotoxinas son reconocidas por los receptores tipo Toll 4 (TLR-4) (Watanabe y cols., 2008) activando genes diana del NF- κ B que luego son responsables de la expresión de iNOs y de la COX-2 (Xia y cols., 2001; Konaka y cols., 1999). Los neutrófilos desencadenan la aparición de radicales superóxido (O_2^-) que reaccionan con el NO que produce peroxinitritos ($ONOO^-$), moléculas altamente reactivas responsables de la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos e inactivación de enzimas (Kobayashi y cols., 2001), origen principal de la apoptosis y necrosis del epitelio gástrico.

Un mecanismo paralelo, también responsable de la producción de ROS y la infiltración leucocitaria que alimenta el ciclo de $ONOO^-$ y exacerba las lesiones, es consecuencia de la inhibición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por los AINE, esto aumenta la entrada de piruvato en las mitocondrias, lo que, debido a la inhibición de la acil-CoA carboxilasa (ACC) por los AINE, conduce al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Asensio y cols., 2007). El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa da lugar a niveles reducidos de Adenosín trifosfato (ATP) (Macpherson y cols., 2010; Basivireddy y cols., 2002). La magnitud de esta vía depende del pK_A de los AINE, a menor pK_A , menor es la concentración requerida para dar lugar a efectos secundarios relacionados con el desacoplo de la fosforilación oxidativa (Mahmud y cols., 1996), esto también explica por qué cuanto más fuerte es el ácido, mayores son las lesiones.

El papel de los iNOS / NO depende del estado redox del epitelio; en condiciones no oxidativas, el NO es una molécula endógena responsable del mantenimiento de la integridad del epitelio GI, aumenta el flujo sanguíneo y promueve la angiogénesis a través de las vías del VEGF (Aktan, 2004; Maharaj y D'Amore, 2007; Laszlo y Whittle, 1998), pero en presencia de O_2^- , como se explicó antes, el NO contribuye a la producción de $ONOO^-$. El NO ha demostrado ser una molécula protectora contra la ulceración gástrica inducida por los AINE mediante un mecanismo independiente de la secreción de ácido gástrico (Khattab, 2001), aunque se sabe que también desempeña un papel como inhibidor en la regulación de la secreción de ácido gástrico (Kato y cols., 1998).

Diferentes estudios mostraron una relación directa entre el ácido y las lesiones GI inducidas por los AINE, de hecho, los principales medicamentos recetados para prevenir

tales lesiones son los inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Fornai y cols., 2005; Lee y cols.1996). Fornai sugiere que los efectos beneficiosos de los IBP en la lesión de la mucosa son probablemente independientes de la vía COX-2/ PGE₂/VEGF (Fornai y cols., 2011), por lo que teniendo en cuenta todas las vías celulares involucradas, se puede deducir que la capa mucosa intacta protege el epitelio de la acción de la pepsina ácida, de los protones, [H⁺] y que cuando la barrera está dañada el ácido agrava las lesiones gástricas. También hay evidencias de un aumento de la concentración basal de ácido gástrico mediado por los AINE debido a la reducción del volumen basal de líquido gástrico (Rodríguez-Stanley y cols., 2006).

Independientemente de que los inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIBS) manifestaron menor daño GI (Pearson y Kelberman, 1996), se sabe que la COX-2 tiene un papel esencial en la cicatrización de las heridas en los enterocitos a través de un mecanismo relacionado con NF-κB y con p38MAPK dependiente de la fosforilación de la histona 3, que es un componente importante de la respuesta de cicatrización de heridas intestinales (Karrasch y cols., 2006). Además, la PGE₂ participa en la diferenciación de las células epiteliales intestinales caliciformes humanas durante las condiciones homeostáticas (Li y cols., 2018) y PGI₂ en la angiogénesis (Whittle y cols., 1978).

Las sales biliares también parecen estar relacionadas con el daño intestinal causado por los AINE al formar micelas super tóxicas (Petruzzelli y cols., 2007; Poplawski y cols., 2006), lesiones que podrían evitarse con PC (Barrios, 2000), lo que también evidencia el papel de la barrera mucosa como factor protector ante el daño GI mediado por los AINE.

En una reciente revisión bibliográfica se resumieron los datos más importantes sobre los efectos del daño GI inducido por los AINE. La primera consecuencia clínicamente reconocida fue el daño del tracto GI superior. Se estima que alrededor del 30% al 50% de los consumidores de AINE exhiben lesiones endoscópicas, principalmente en el antro gástrico, a menudo sin manifestaciones clínicas. Hasta el 40% experimentan síntomas GI superiores, como dispepsia o reflujo gastroesofágico, aunque no son síntomas predictivos del daño de la mucosa, ya que aproximadamente el 50% de los pacientes sintomáticos no presentan daño en la mucosa. En contraste, más del 50% de los pacientes con complicaciones graves de úlcera péptica no tenían síntomas de advertencia previos. Las complicaciones graves, como sangrado, perforación u obstrucción se presentan en un 1–2% de los consumidores. Como conclusión el consumo de AINE se pudo asociar con un

aumento de 3 a 5 veces el riesgo de complicaciones GI superiores y que las terapias de prevención deben implementarse en función de la presencia de factores de riesgo, no en la aparición de síntomas dispépticos. Algunos de los factores de riesgo identificados son la edad (>65 años), terapias concomitantes con anticoagulantes, recaptadores selectivos de serotonina, corticosteroides, 2 o más AINE al mismo tiempo (García-Rayado y cols., 2018).

También hay evidencias de daños en el tracto GI inferior, aunque este daño no ha sido aún bien caracterizado. Un estudio reciente en 120 pacientes de AINE convencionales y 40 con inhibidores selectivos de la COX-2 mostró que el 62% y 50% de los pacientes respectivamente, presentaban alteraciones en el intestino delgado como pliegues enrojecidos o daños de la mucosa. Hay datos que sugieren que la prevalencia de los efectos adversos asociados a los AINE, incluidos los efectos clínicos y subclínicos, podrían ser mayores en el intestino delgado que en el tracto GI superior. Entre las lesiones producidas a este nivel se encuentran el aumento de la permeabilidad intestinal, inflamación, pérdida de sangre, anemia, malabsorción, pérdida de proteínas y ulceración de la mucosa (García-Rayado y cols., 2018).

Tal y como se muestra en los datos de mercado y uso de AINE, el coste del manejo del dolor y enfermedades inflamatorias con este grupo de medicamentos está bien documentado, sin embargo, no hay muchos datos recientes sobre el impacto económico que tienen los efectos secundarios GI derivados de su uso. Un estudio publicado en 2001 estimó que en Estados Unidos cada año más de 100.000 pacientes eran hospitalizados solo por complicaciones GI relacionadas con AINE, con costos directos que iban desde 1800 a 8500 dólares (\$) por paciente. Unas 16.500 personas morían anualmente por estas complicaciones y que, en los ancianos el coste médico de los eventos GI adversos asociados con el uso de AINE superaban los 4 mil millones de \$ al año (Bidaut-Russell y Gabriel, 2001). En un estudio tipo encuesta poblacional, llevado a cabo en España en el año 2002, en el que participaron 2.988 sujetos, pudo concluirse que la frecuencia de episodios adversos GI entre los consumidores de AINE era de un 23,7% (IC del 95%, 12,0-35,5), siendo causa de consultas médicas en un 72,5% de las veces (Ballina y cols., 2002). En otro estudio de 2015, se llevó a cabo una evaluación económica retrospectiva de la restricción llevada a cabo en España en el uso de piroxicam, debido a un riesgo constatado de complicaciones GI graves mayor que el de otros AINE. A través de estudios de coste-efectividad, se obtuvieron los costes de las complicaciones GI graves, como

resultado se estimó una reducción de 2,75 casos de complicaciones GI graves por cada 10.000 pacientes, con un ahorro estimado en España de 578.608 € en el primer año tras la restricción en su uso (Martínez, 2015).

3.1. Inhibidores de la bomba de protones: tratamiento clásico y efectos secundarios.

Tal y como se ha descrito en la sección 1, la liberación de ácido estomacal, además de permitir la digestión de alimentos y otros xenobióticos, constituye una de las primeras barreras de defensa del organismo al impedir la colonización del tracto GI por parte de determinadas bacterias. Aunque el uso de los IBP está altamente aceptado y se considera que tienen un perfil beneficio-riesgo adecuado, diferentes estudios han demostrado un cambio en la colonización bacteriana en pacientes que toman IBP, uno de estos estudios asoció el uso de estos fármacos con una disminución de la riqueza bacteriana y con cambios profundos en el microbioma intestinal hasta el punto de que el 20% de las bacterias identificadas presentaban variaciones significativas y se encontraron bacterias orales y potencialmente patógenas en el intestino (Imhann y cols., 2015). Otros estudios asocian la hipoclorhidria y aclorhidria con un mayor riesgo de infecciones entéricas por *Vibrio Cholerae*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Clostridium difficile* o infecciones parasitarias como giardiasis o amebiasis (Arriola y cols., 2016; Kwok y cols., 2012; Yang y Metz, 2010). Varios estudios han demostrado una relación directa entre el uso de fármacos inhibidores de la secreción ácida y el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) (Compare y cols., 2011; Lombardo y cols., 2010) aunque también existe un estudio retrospectivo, en 1.191 pacientes que no encontró asociación estadísticamente significativa entre ambos (Ratuapli y cols., 2012).

Otros efectos secundarios que se han asociado al uso de IBP incluyen la hipomagnesemia (Cheungpasitporn y cols., 2015), cuyo riesgo se incrementa en usuarios crónicos de IBP (Hess y cols., 2012), de edad avanzada (Pastorino y cols., 2015) y con la administración concomitante de diuréticos (Kieboom y cols., 2015). También se ha visto un incremento en el riesgo de enfermedades renales crónicas (Hussain y cols., 2019) o fracturas de cadera en determinados grupos de población (Hussain y cols., 2018; Zhou y cols., 2016).

En resumen, podemos afirmar que, aunque es un tratamiento seguro y ampliamente aceptado, el uso de los IBP para paliar los efectos GI de los AINE, tiene a su vez efectos secundarios, el principal está relacionado con cambios en la microbiota intestinal, lo que

según estudios recientes tendría implicaciones directas en el organismo y una repercusión mayor en el estado de salud de lo que se conocía (Avelar y cols., 2019; Sommer y cols., 2017; Zhang y cols., 2019).

4. MELATONINA

4.1. Generalidades

La melatonina (MLT) es una hormona endógena sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal (Macchi y Bruce, 2004) que fue aislada e identificada químicamente como N-acetil-5-metoxitriptamina por primera vez en la década de 1960 (Lerner y cols., 1960).

El triptófano es la molécula precursora para la síntesis endógena de MLT (Figura 28). Este aminoácido esencial se transforma en serotonina que se convierte en MLT en dos reacciones secuenciales que implican dos enzimas: Serotonina-N-acetil transferasa (NAT) e Hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Axelrod y Weissbach, 1960; Klein y Moore, 1979). La MLT también es sintetizada por las células del sistema inmunitario, el cerebro, el epitelio de las vías respiratorias, tejido óseo, médula, intestino, ovario, testículos, piel y otros (Reiter y cols., 2009). Su síntesis es estimulada por las señales provenientes del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, responsable de los ritmos circadianos. Cuando la retina deja de detectar una cierta cantidad de luz de longitud de onda azul, el núcleo supraquiasmático recibe la señal e induce la producción de MLT en la glándula pineal, esto cesa cuando la retina detecta la luz de la mañana y comienza la producción de las hormonas asociadas al estado de vigilia. Este ciclo ayuda a crear el ritmo circadiano de sueño-vigilia de 24 horas (Gillette y McArthur, 1996).

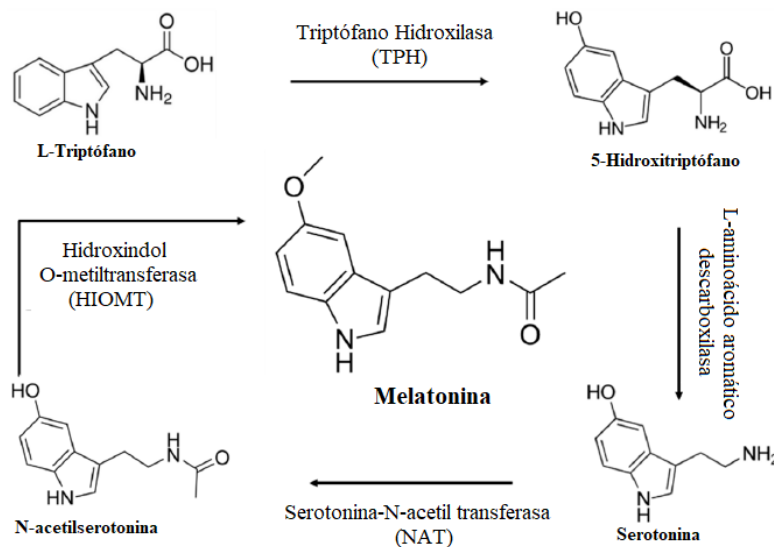


Figura 28. Esquema de la síntesis de melatonina a partir de triptófano. Figura editada con EdrawTMMMax 9.4

4.2. Funciones fisiológicas y mecanismo de acción

La MLT tiene tres funciones fisiológicas principales: la regulación de ritmos biológicos o circadianos, la inmunomodulación y como antioxidante.

La glándula pineal, a través de la síntesis de MLT, constituye el nexo entre el medio ambiente luminoso y los sistemas nervioso y endocrino. Los efectos en la regulación de los ritmos circadianos están mediados principalmente por los receptores de membrana, el MT1 y el MT2 (Dubocovich y Markowska, 2005). En cuanto a la inmunomodulación, se ha demostrado que la MLT actúa específicamente sobre receptores MT2 expresados en células inmunocompetentes y regular las respuestas tanto celulares como humorales (Drazen y Nelson, 2001). Además, interactúa con los receptores de unión nuclear, ROR1 (receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1) y ROR2, identificados en linfocitos y monocitos (Hardeland, 2008), también ha demostrado inducir la síntesis de IL-4 en TCD4 (Maestroni y Covacci, 1994) entre otras IL.

Los efectos antioxidantes de la MLT han sido ampliamente descritos y documentados (Tan y cols., 2007), se le atribuye capacidad como antioxidante directo al reaccionar con los RL (Reiter y cols., 2003) y la capacidad de incrementar la actividad de enzimas y otros sistemas antioxidantes. Aumenta la producción de glutatión mediante la estimulación de la γ -glutamylcisteína sintasa, enzima limitante en la vía de síntesis de glutatión (Urata y cols., 1999), estimula la G6PDH, responsable de la producción de NADPH (Pierrefiche y Laborit, 1995) y estimula otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Leon y cols., 2004). Además, se sabe que inhibe la activación del factor nuclear NF- κ B (Sainz y cols., 2008), que tal y como se ha expuesto en la sección de inflamación es uno de los mediadores del proceso inflamatorio inducido por los RL.

Este incremento en la capacidad de defensa antioxidante endógena por parte de la MLT aumenta la primera línea de defensa contra el daño oxidativo de las células (Rodríguez y cols., 2004).

Considerando lo anterior, se evaluó el papel de la MLT como antioxidante en enfermedades relacionadas con la inflamación en un artículo de revisión.

**4.3. Papel de la melatonina en el estrés oxidativo y la inflamación (*Artículo
1 Revisión*)**

Artículo 1

(Revisión)

Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin

(El estrés oxidativo en la inflamación: Papel de la Melatonina)

Autores: Aroha Sánchez. Ana Cristina Calpena y Beatriz Clares

International Journal of Molecular Sciences 2015;16. 16981-17004

Índice de impacto: 4.18 (ISI Journal Citations Reports)

Categoría: **Medicina (Q1)**
 Biología molecular (Q2)

RESUMEN

El oxígeno es utilizado por las células eucariotas para las transformaciones metabólicas y la producción de energía en las mitocondrias. En condiciones fisiológicas hay una producción endógena constante de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y de nitrógeno (RNI) que interactúan como moléculas de señalización en los mecanismos fisiológicos. Cuando estas especies no son eliminadas por los antioxidantes o se producen en exceso, aparece el estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede dañar proteínas, lípidos, ADN y orgánulos celulares. Se trata de un proceso directamente relacionado con la inflamación, de hecho, las células inflamatorias secretan una gran cantidad de citocinas y quimiocinas responsables de la producción de ROI y RNI en células fagocíticas y no fagocíticas a través de la activación de la señalización de las proteínas quinasas. Actualmente, existe una amplia variedad de enfermedades capaces de producir manifestaciones inflamatorias. Si bien, a corto plazo la mayoría de estas enfermedades no son fatales, si tienen un gran impacto en la calidad de vida dado que existe una relación directa entre la inflamación crónica y muchos trastornos emergentes como el cáncer, enfermedades periodontales, enfermedades renales, fibromialgia, enfermedades crónicas GI o enfermedades reumáticas. El objetivo de esta revisión es describir el uso y el papel de la MLT, una hormona secretada por la glándula pineal que funciona directa e indirectamente eliminando radicales libres como un potente antioxidante.

Review

Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin

Aroha Sánchez ^{1,†}, Ana Cristina Calpena ^{1,†} and Beatriz Clares ^{2,†,*}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Avenue, Barcelona 08028, Spain; E-Mails: asanchmi12@alumnes.ub.edu (A.S.); anacalpena@ub.edu (A.C.C.)

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja Street, Granada 18071, Spain

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: beatrizclares@ugr.es; Tel.: +34-958-243-900; Fax: +34-958-248-958.

Academic Editor: Guido Haenen

Received: 28 June 2015 / Accepted: 15 July 2015 / Published: 27 July 2015

Abstract: Oxygen is used by eukaryotic cells for metabolic transformations and energy production in mitochondria. Under physiological conditions, there is a constant endogenous production of intermediates of reactive oxygen (ROI) and nitrogen species (RNI) that interact as signaling molecules in physiological mechanisms. When these species are not eliminated by antioxidants or are produced in excess, oxidative stress arises. Oxidative stress can damage proteins, lipids, DNA, and organelles. It is a process directly linked to inflammation; in fact, inflammatory cells secrete a large number of cytokines and chemokines responsible for the production of ROI and RNI in phagocytic and nonphagocytic cells through the activation of protein kinases signaling. Currently, there is a wide variety of diseases capable of producing inflammatory manifestations. While, in the short term, most of these diseases are not fatal they have a major impact on life quality. Since there is a direct relationship between chronic inflammation and many emerging disorders like cancer, oral diseases, kidney diseases, fibromyalgia, gastrointestinal chronic diseases or rheumatic diseases, the aim of this review is to describe the use and role of melatonin, a hormone secreted by the pineal gland, that works directly and indirectly as a free radical scavenger, like a potent antioxidant.

Keywords: antioxidant; melatonin; oxidative stress; inflammation; chronic diseases

1. Introduction

Eukaryotic cells use the oxidation of nutrients as an energy source to obtain ATP. In the complete oxidation process of glucose by cells, several metabolic pathways (glycolysis, Krebs cycle, and electron transport chain (ETC)) and several cell compartments (cytoplasm, membrane and mitochondrial matrix) are involved. In the ETC, electrons from nicotinamide–adenine–dinucleotide phosphate (NADH) are transported sequentially by a series of redox reactions through the complex I, ubiquinone, complex III cytochrome c, and finally to the complex IV, where in a reaction catalyzed by cytochrome oxidase, electrons are sold to molecular oxygen producing H₂O. Thus, the major role of oxygen for all aerobic organisms is acting as final acceptor for electrons [1]. Under physiological conditions, enzymes of the mitochondrial respiratory chain, NADPH, succinate dehydrogenase (SDH), ubiquinone, cytochrome c reductase, cytochrome b5, monoamine oxidases (MAO-A and MAO-B), mitochondrial aconitase, ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDHC, 2-oxoglutarate dehydrogenase), dihydroorotate dehydrogenase (DHOH), pyruvate dehydrogenase complex (PGDH), oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC), as a consequence of metabolism, are responsible for a constant endogenous production of free radicals (FR) as reactive oxygen intermediates (ROI) and nitrogen species (RNI) [2]. These intermediates interact as signaling molecules for metabolism, cell cycle, and intracellular transduction pathways [3]. These species are also produced in response to exposure to exogenous agents as UV, ionizing radiation or air pollution [4]. The main source of reactive oxygen species (ROS) generation is the ETC in mitochondria. However, there are also non-mitochondrial sources of reactive molecules and FR that include respiratory burst of phagocytic cells, various oxidases reductases which catalyze one-electron-transfer reactions, uncoupled endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), lipoxygenase (LOX), and microsomal cytochrome P450 enzymatic metabolism of xenobiotic compounds [2]. As a consequence of the purine's metabolism in the cytoplasm, carried out by xanthine oxidase (XO), there is also a production of another potent ROS [5].

A FR is an atom or molecule that has an unpaired electron in the external orbit, making it highly unstable and reactive. These species can be stabilized by capturing the needed electron from nearby biomolecules [6]. When these species are not eliminated by antioxidants, or are produced in excess, oxidative stress appears; thus, oxidative stress is a process characterized by a biochemical imbalance between FR or ROI and antioxidants [7]. Oxidative stress has implications for body homeostasis because FRs damage proteins, lipids, DNA, and organelles by reacting with them. It is directly linked to inflammation since inflammatory cells secrete a large number of cytokines and chemokines responsible for the production of new ROI and RNI in phagocytic and non-phagocytic cells through the activation of protein-kinases signaling [8], so we can say that oxidative stress is a cyclic process which has a positive feedback.

Biological systems have developed the ability to detoxify chemically-active ROS and RNS. These antioxidant mechanisms include complex non-enzymatic systems, such as glutathione (GSH), vitamins A, C and E, as well as enzymes such as catalase, superoxide dismutase (SOD), and various peroxidases. Insufficient levels of antioxidants, or inhibition of the antioxidant enzymes, also promote oxidative stress [9]. An important component of the detoxificant cellular system is the transcription factor that controls the expression of a large pool of antioxidant and cytoprotective genes in response to stimulation of

oxidants or electrophilic molecules: This is the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is negatively regulated by Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) [10].

2. Oxidative Stress, Inflammation and Chronic Diseases

As we discussed above, when an imbalance between FR and antioxidants, due to an uncontrolled and excessive generation of ROS takes place, oxidative stress occurs. These ROS, especially those derived from mitochondria, stimulate the activation of mediator signaling molecules as the transcription factor nuclear factor kappa-B (NF- κ B) [11], that up-regulates the production of inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) or tumor necrosis factor- α (TNF- α) [12] and others mediators, as iNOS or cyclooxygenase-2 (COX-2) [13]. Moreover, ROS can damage cellular lipids, lipid peroxidation products, and lipid-derived aldehydes as malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), and acrolein, which are implicated in numerous oxidative stress-induced inflammatory diseases with harmful effects [14]. Proteins and DNA may also be damaged by ROS; the DNA damage can cause mutations and is implicated in the initiation and/or promotion of inflammation-mediated carcinogenesis [15]. NF- κ B is activated by an important type of membrane receptor that is related to oxidative stress and inflammation, and whose regulation is the mechanism of action for certain antioxidant molecules to inhibit the inflammatory process. These membrane receptors are the toll-like receptor 4 (TLR-4) [16,17].

Inflammation is a normal protective response to a variety of cell and tissue damage. Its role is to remove harmful cells and tissues, as well as repair them. Uncontrolled inflammatory response results in extensive cell and tissue damage, giving rise to normal cell and tissue destruction, which is associated with chronic inflammation and various human chronic diseases [18]. ROS and inflammation have been identified in the pathogenesis and development of a great number of unrelated diseases including cancer [19]; nervous system diseases, such as psychiatric disorders [20], Alzheimer's [21], Parkinson's [22] and traumatic brain injury [23], cardiovascular diseases as atherosclerosis [24], metabolic diseases as diabetes mellitus II [25], periodontal disease [26], chronic kidney disease [27], gastrointestinal autoimmune diseases (Ulcerative colitis and Crohn) [28], other autoimmune diseases as multiple sclerosis [29], rheumatoid arthritis [30], hepatic diseases [31], and others as fibromyalgia [32,33].

Taking into account the recounted above, production of FR is an inevitable consequence of cellular respiration. If it is not controlled, it may lead to inflammatory and chronic diseases. Thus, what can we do? We can avoid an excessive production of these FR, or we can control antioxidant systems using free radical scavenger molecules such as melatonin (MLT), a potent antioxidant.

3. Melatonin: An Overview

Melatonin is an endogenous hormone mainly synthesized and secreted by the pineal gland [34], which was isolated and chemically identified as *N*-acetyl-5-methoxytryptamine for the first time in the 1960's [35]. Tryptophan is the precursor molecule for the synthesis of MLT (Figure 1). This essential amino acid is transformed to serotonin. Then, serotonin is converted into MLT in two sequential reactions involving two enzymes: serotonin-*N*-acetyl transferase (NAT) and hydroxyindole-*O*-methyl transferase (HIOMT) [36,37]. MLT is also produced by immune system cells, brain, airway epithelium, bone marrow, gut, ovary, testes, skin, and others [38]. MLT, and its derivatives', behavior as free radical scavengers are well documented [39]. There is a large body of evidence of the use of MLT as a potent

antioxidant because of such behavior. Below the potential use of MLT in various diseases given its antioxidant activity is described.

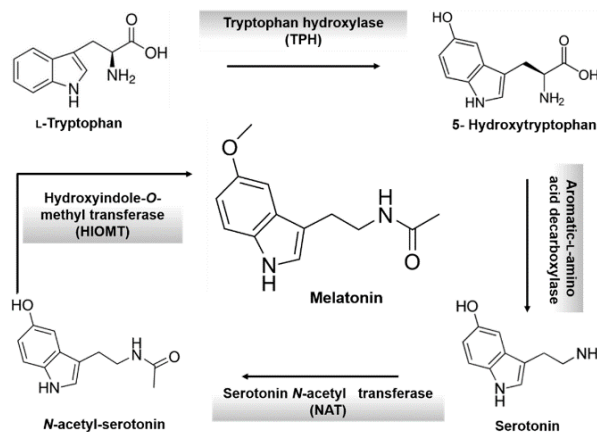


Figure 1. Biosynthesis of melatonin from tryptophan.

MLT possesses certain advantages when compared with other antioxidant molecules due to its important physical and chemical properties. It is a hormone found naturally in the body. The amphiphilicity of MLT enables molecules to enter all organs and subcellular compartments which represents a difference with other physiological radical scavengers. Furthermore, MLT is estimated to detoxify, via its cascade of reactions, up to 10 radicals, increasing the effective concentrations [39]. Compared with other antioxidant, MLT has shown to have equal or better efficacy in protecting tissues from oxidative injury (Vitamin C and E). Another inherent characteristic of MLT is the selectivity for mitochondrial membrane, which is not shared by other antioxidants and may be the most interesting advantage of the pineal hormone [40].

Regarding its toxicity, acute toxicity of MLT in animal and human studies is extremely low [41], with a very wide margin of safety [42]. There are no data about serious toxicological effects. Some side effects have been observed in clinical studies, most of them related to sleepiness and fatigue [43]. Another described side effect in a six-month, double-blind, crossover study, using 3 mg/day of MLT, was the alteration of semen quality in healthy men [44].

4. Role of Melatonin in Cancer

Carcinogenesis is a long, multistep, and often slow process that may start with the accumulation of FR leading to mutations in the genetic material of cells and thus the transformation of a normal cell into a cancerous cell, which reproduces without control, resulting in an imbalance between proliferation and cellular death [8]. Cellular mediators and cellular effectors of inflammation are important constituents of the local environment of tumors. Inflammation leads to tumor processes and, conversely, in some types of cancer, an oncogenic change induces an inflammatory response. These mediators and cellular effectors of inflammation have many tumor-promoting effects as proliferation and survival of malignant

cells, angiogenesis, and metastasis promotion subvert adaptive immune responses and alter responses to hormones and chemotherapeutic agents [45].

Key molecules involved in cancer and inflammation that are the link for these two processes include transcription factors, as previously mentioned, NF- κ B or signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-23 and TNF- α .

NF- κ B is a significant coordinator of innate immunity and inflammation. It is also an important endogenous tumor promoter [46]; this is a protein complex that controls DNA transcription by the following mechanism of action: NF- κ B inactivated state is located in the cytosol and complexed with the inhibitory protein I κ B α . Different extracellular signals, such as oxidative stress, cytokines, FR, UV irradiation, or bacterial and viral antigens, can activate the I κ B kinase (IKK). This IKK is an enzyme that phosphorylates the I κ B α , which results in ubiquitination, dissociation of I κ B α from NF- κ B, and degradation of I κ B α by the proteasome. This dissociation has, as a result, the NF- κ B activation and its translocation into the nucleus, where it binds to specific sequences of DNA called response elements (RE). The DNA/NF- κ B complex recruits co-activators and RNA polymerase, which transcribes DNA into mRNA [47,48]. The mRNA is transcribed into a large number of the pro-inflammatory gene family, including cytokines (e.g., TNF- α , IL), chemokines, adhesion molecules, and inflammatory enzymes (e.g., iNOS, COX-2, 5-lipoxygenase) [49].

Another important transcription factor is the already mentioned Nrf2. There is accumulated evidence that Keap1/Nrf2 mutations or unbalanced regulation lead to over-expression or hyperactivation of Nrf2 and may participate in tumorigenesis and be involved in chemoresistance of both solid cancers and leukemias. In addition to protecting cells from ROS, Nrf2 seems to play a direct role in cell growth control and is related to apoptosis-regulating pathways. Moreover, Nrf2 activity is connected with oncogenic kinase pathways, structural proteins, hormonal regulation, other transcription factors, and epigenetic enzymes involved in the pathogenesis of various types of tumors [11].

IL-1 and IL-6 activate the JAK-STAT3 (Janus-activated kinase), SHP-2-Ras-ERK, and PI3K-Akt pathways, through which induce cell proliferation, survival, EMT/invasion, metastasis, angiogenesis, and inflammation [50]. Angiogenesis is a crucial process involved in cancer and metastasis that allows new blood vessel formation from pre-existing vasculature during some physiological processes like embryogenesis, wound healing, and the reproductive cycle in adults. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and NF- κ B are important factors involved in solid tumor angiogenesis [51,52].

A family of proteins involved in tumor progression are the endothelins which include endothelin-1, 2 and 3 (ET-1, ET-2 and ET-3). They are involved in vasoconstriction, pain, inflammation, and cancer [53]. These participate specifically in cell proliferation of vascular and non-vascular cells [54]. High levels of ET-1, the predominant isoform, have been found in the plasma of patients with solid tumors [55]. Thus ET-1 is a tumor marker in colorectal, prostate, liver, breast, and ovarian cancers. In these tumor cells, this peptide promotes cell proliferation, angiogenesis, and metastasis and suppresses apoptosis [56]. The *edn-1* is the gene that encodes ET-1. The *edn-1* is transcribed to mRNA, this mRNA is translated to prepoET-1 and then endothelin-converting enzyme (ECE-1) forms the biologically active peptide ET-1 [57].

MLT has been shown to inhibit cancer cell growth in numerous studies and through different mechanisms of action. In the following lines of this review the main ways that seem to be involved in tumor inhibition by MLT are described.

MLT inhibits *edn-1* mRNA expression (the first step in ET-1 synthesis), ECE-1 protein expression and the release of ET-1 from colorectal cancer cells *in vitro*. The inhibition of *edn-1* expression is due to an inactivation of FoxO1 and NF- κ B transcription factors [58]. Pharmacologic concentrations of MLT inhibit angiogenesis by suppressing VEGF mRNA and VEGF protein induced by the hypoxia mimetic CoCl₂ in all three human cancer cell lines. Decreased mRNA levels by VEGF were found to be associated with decreased hypoxia-inducible factor HIF-1 α protein levels [59]. This is the most important regulator of VEGF [60]. Haddadi *et al.* [61] evaluated the effect of MLT on the modulation of *TNF- α* gene expression, and they found that the oral administration of MLT modulated the *TNF- α* overexpression.

High doses of MLT (1, 2 and 3 mM) have been shown to cause significant and progressive suppression of DNA synthesis in a cell line derived from a murine colon carcinoma [62]. Another mechanism whereby MLT inhibits cancer cell growth is the decrease in telomerase expression in MCF-7 tumor cells. Telomerase is an enzyme responsible for telomere elongation which is activated in most human cancers [63]. Moreover, once tumors are formed, MLT also seems to control their growth. In hepatoma cells, MLT inhibits, via membrane receptor-mediated processes, the uptake and metabolism of fatty acids, including linoleic acid (LA), and its conversion to the mitogenic signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) [64]. Some studies have shown that MLT has an antitumoral effect alone or in combination with others antitumoral agents, in animal or *in vitro* models of pancreatic tumors chemically-induced by different agents [65–67].

MLT may exhibit anticancer activity through several mechanisms, including antiproliferative, antioxidant, and immunostimulating effects. Some authors have conducted studies to test whether MLT could be useful in the treatment of human cancer. They tested MLT activity alone, or in combination with chemotherapeutic drugs, and compared to conventional anticancer therapies. Table 1 summarizes some clinical trials that have tested the potential role of MLT as an antitumoral or as adjuvant in cancer therapies.

Table 1. Clinical trials that have tested the potential role of MLT as an antitumoral or as adjuvant in cancer therapies.

Tumor	Treatment	Results and Conclusions	References
Metastatic non-small cell lung cancer	MLT + CisP + etoposide	Better tolerance to chemotherapy. Improve the efficacy of chemotherapy in terms of both survival and quality of life.	[68]
Metastatic cancer	MLT	Decline in VEGF secretion and control of the neoplastic growth.	[69]
Chronic lymphocytic leukemia	Cyclophosphamide + somatostatin + bromocriptine + retinoids + MLT + ACTH	Partial remission after 2 months and continued treatment. Patients hadn't got disease recurrence. No toxicity.	[70]
Metastatic melanoma	MLT + IL-2 + Cisp	No Cisplatin-related neurotoxicity was observed. Effective and well tolerated treatment. Clinical efficacy at least comparable to that obtained with a first-line therapy of dacarbazine plus interferon- α .	[71]

Table 1. Cont.

Tumor	Treatment	Results and Conclusions	References
Non-Hodgkin's lymphomas (NHL)	Cyclophosphamide + somatostatin + bromocriptin + retinoids + MLT + ACTH	70% of participants had a partial response. 20% of participants had stable disease. 10% progressed on therapy. The combination was effective in treatment of low-grade NHL at advanced stage.	[72]
Advances solid neoplasms: non-small cell lung cancer (NSCLC) or gastrointestinal tumors	NSCLC: MLT + CisP + etoposide or gemcitabine; Colorectal cancer: MLT + OxiP + 5-FU or MLT + Etoposide or MLT + 5-FU + FA; Gastric cancer: MLT + CisP + Epirubicin + 5-FU + FA or MLT + 5-FU + FA	Regression rate achieved in MLT patients treated significantly higher than in those treated with chemotherapy alone and 2-year survival rate significantly higher in patients concomitantly treated with MLT.	[73]
Metastatic solid tumour: lung cancer, breast cancer, gastrointestinal tract neoplasms, head and neck cancers	Lung cancer: MLT + CisP + etoposide or MLT + gemcitabine; Breast cancer: MLT + Doxorubicin or MLT + Mitoxantrone or MLT + Paclitaxel; Gastrointestinal tumors: MLT + 5-FU + FA; Head and neck cancers: MLT + 5-FU + CisP	1-year survival rate and the objective tumour regression rate significantly higher in patients concomitantly treated with MLT than in those who received chemotherapy alone. MLT significantly reduced the frequency of thrombocytopenia, neurotoxicity, cardiotoxicity, stomatitis and asthenia.	[74]
Lymph node relapses due to malignant melanoma.	MLT	Disease-free survival in melanoma patients surgically treated for regional node recurrence was significantly higher in MLT-treated individuals than in controls.	[75]

Abbreviations: MLT, Melatonin; ACTH, Adrenocorticotrophic hormone; CisP, Cisplatin; 5-FU, 5-Fluoracile; FA, Folates; OxiP, oxiplatin. In all cases MLT dose was 20 mg/day.

Results obtained from clinical trials suggest that MLT is an effective treatment for some types of neoplasm, either by improving the progression of the disease by controlling the growth and size of tumors, improving the effectiveness of classic chemotherapies or improving tolerance to them. Results also show improvements in the quality of life for patients when MLT is included in the anticancer therapy and, in some cases, significantly higher survival rates were obtained.

Finally, last years the protective effect of MLT against UV radiation has been proposed by its direct and indirect antioxidant activity (free radical scavenger and stimulation of antioxidant enzymes) [76]. UV radiation causes a neutrophilic inflammatory response. However, the main effect is related to tumor-initiating DNA mutations in melanocytes (melanoma) [77]. Several studies have demonstrated these effects [78,79].

5. Role of Melatonin in Oral Health

Oral health is essential to general health and quality of life, and according to the World Health Organization (WHO), is defined as the state of being free from mouth and facial pain, oral and throat cancer, oral infection and sores, periodontal (gum) disease, tooth decay, tooth loss, and other diseases and disorders that limit an individual's capacity in biting, chewing, smiling, speaking, and psychosocial wellbeing.

Most prevalent inflammatory oral disease is gingivitis (gum tissue inflammation). Gingivitis, untreated due to a chronic exposure or accumulation of bacteria in the gingival sulcus of the mouth, will lead to an immune response where cells secrete lytic enzymes which, together with bacterial toxins, degrade collagen and glycosaminoglycans. This leads to a breakdown of bone and connective tissue that hold teeth in place. If not treated, the bones, gums, and tissue that support the teeth are destroyed [80,81]. Severe periodontal (gum) disease, periodontitis, may result in tooth loss. It is found in 15%–20% of middle-aged (35–44 years) adults [82].

Risk factors for oral diseases include an unhealthy diet [83], tobacco use, and harmful alcohol use [84–86] (Figure 2). These are also risk factors for the four leading chronic diseases (cardiovascular diseases, cancer, chronic respiratory diseases, and diabetes) and oral diseases are often linked to chronic disease. Potentially, the most popular is the link between diabetes and periodontitis [87,88].

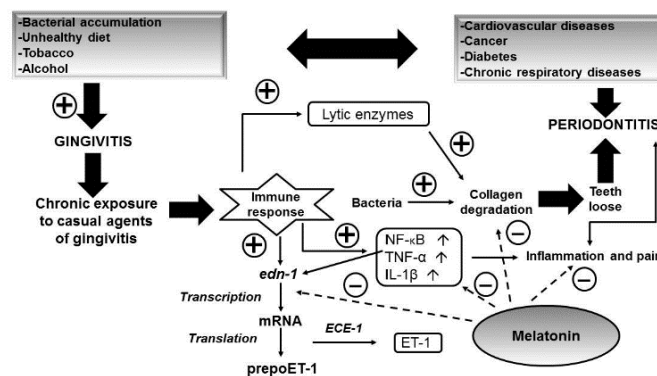


Figure 2. Diagram of the main mechanisms for the development of the oral diseases based on inflammation and oxidative stress: gingivitis and periodontitis and the role of MLT in their inhibition. Positive signs mean induction and negative inhibition. The line explains the cascade of reactions which relates gingivitis with periodontitis and involved exogenous and endogenous factors. The dotted line indicates where the activity of melatonin is targeted.

Eventually these diseases are linked to inflammatory processes and the mechanism of activation and propagation of the underlying inflammatory process is, in a great many cases, oxidative stress [89,90]. Avezov *et al.* summarizes the main sources of oxidative stress in the oral cavity and pathological outcomes [91].

Taking into account the direct relationship between the inflammatory process, oxidative stress, and these diseases, antioxidants are a possible mechanism in reducing gingival inflammation [92]. Thus, it can be thought that the establishment of antioxidant therapies, such as MLT, help to assist or remove the pathological complex network of interactions that may be established. There is already much evidence supporting this.

Some authors suggest that MLT saliva levels have a protective role in oral cavity tissue from oxidative stress damage [93–95]. Others propose that there is a direct relationship between these MLT levels and oral health [96–98].

In a rat pulp inflammation (pulpitis) model, TLR4/NF- κ B signaling is activated [99,100] to increase serum levels of NF- κ B, TNF- α , and IL-1 β . MLT has been shown to suppress this increase and the percentage of necrosis of the injured pulp cells via TLR4/NF- κ B signaling inhibition. MLT could also regulate the expression of TLR4/NF- κ B signaling in LPS-stimulated human dental pulp cells [101]. In another experimental model of periodontitis in rats, MLT reduced inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α) levels, regulated oxidative stress parameters, such as malondialdehyde (MDA) or glutathione (GSH), and decreased periodontal tissue destruction [102]. The *in vitro* effect of MLT in gingival human fibroblasts has been also studied and it has been found that MLT has anti-fibrotic and anti-inflammatory properties via inhibition of endothelin-1 and TGF-B1, and increasing collagen and IL-10 levels [103].

Taking into account that MLT is a nontoxic endogenous human hormone; it has powerful antioxidant, anti-inflammatory, and immunoenhancing activities, and participates in proliferation and bone remodeling [104]. It can be concluded that MLT is a potential candidate for the treatment of oral diseases.

6. Role of Melatonin in Kidney Chronic Disease

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by increased levels of oxidative stress and inflammation. Oxidative stress and inflammation promote renal injury via damage to molecular components of the kidney by different mechanism of action. ROS oxidize the amino acids in the nephron, resulting in the loss of important functional properties [105–107], lipid peroxidation of cell membrane decrease membrane viability [108], and cleavage and crosslinking of renal DNA occurs leading harmful mutations [109,110]. Moreover, other ROS interactions in the nephron give rise to secondary radical production [111].

The therapeutic and protective effect of MLT against this kind of kidney damage has been shown in animal models [112,113]. There are a large number of studies of oxidative stress induced by exogenous drugs in which MLT has demonstrated a protective role; for example, in an oxidative stress animal model after a cisplatin administration [114].

Other kidney disease, which the use of MLT seems interesting, is ischemia/reperfusion injury (IRI), a major problem in clinical renal transplantation. Severe IRI of cadaveric kidney grafts, often caused by prolonged cold storage, contributes to delayed graft function and acute renal failure [115]. It is generally believed that ROS and RNS play the principal role in the mediation of IRI [116]. Li *et al.* have demonstrated that MLT protects kidney grafts from IRI through the inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation by improving recovery of renal and cellular function, reduces histological tubular damage index, and increases survival after reperfusion. As a pathophysiological explanation, MLT was shown to significantly reduce oxidative stress (lipid peroxidation) and induce SOD, while down-regulating NF- κ B and iNOS and subsequently caspase-3-dependent apoptosis [117].

7. Role of Melatonin in Fibromyalgia

Fibromyalgia (FM) is a syndrome characterized by widespread pain, diffuse tenderness, and multiple symptoms including fatigue, sleep disturbances, cognitive dysfunction, and depressive episodes [118]. Since the main symptoms in FM (pain, stiffness and fatigue) are located in the muscles, muscle biopsies, mostly from the trapezius, have been studied. Biopsies of muscle have demonstrated inflammatory markers, subsarcolemmal mitochondrial accumulation, abnormal mitochondria, higher incidence of ragged

red fibers, and defects of cytochrome-c-oxidase (complex IV of oxidative phosphorylation) [119,120]. Most recent studies have shown the implication of mitochondrial oxidative stress in the peripheral nociception described in FM as an important symptom which is mediated by inflammatory activation [32].

There is a phase II, randomized, double-dummy, controlled trial showing that the exogenous MLT administration (10 mg/day) increases the inhibitory endogenous pain-modulating system as assessed by the reduction on the numerical pain scale (0–10). In this study MLT alone, or associated with amitriptyline, was better than amitriptyline alone in improving pain on the visual analog scale [121]. Another randomized trial demonstrated that administration of MLT alone, or in combination with fluoxetine (3–5 mg/day), was effective in the treatment of fibromyalgia [122]. Taking into account the implication of oxidative stress in FM and the reported results, we believe that the mechanism of action implicated is the MLT activity as antioxidant.

8. Role of Melatonin in Inflammatory Bowel Disease

Chronic inflammation of intestinal tract or part thereof leads to the two major inflammatory bowel diseases (IBDs): Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) [123]. Although the main characteristic of both diseases is a relapsing immune activation which leads to an uncontrolled inflammation of the intestinal mucosa, they have different clinical symptoms and different histopathological characteristics [124,125]. UC is located at the large intestine (colon) [126] and CD can affect any part of the digestive tract from the mouth to the anus [127,128]. The role of ROS and RNS in the pathogenesis of both diseases [28,129] is known; that is, despite an exacerbated immune response in both diseases, each follows a different pathway to cause damage in intestinal cells. An excessive T helper 1 (TH1) response is linked with CD and an excessive TH2 phenotype is associated to the development of UC [123].

In UC patients significantly higher serum concentrations of cytokines such as IL-13 (anti-inflammatory cytokine), IL-17 (proinflammatory cytokine), C reactive protein (CRP) has been observed [130]. Other UC markers are IL-1 β [131] and COX-2 [132]. Pentraxin 3 (PTX3) [133], which is not merely a marker, but directly involved in the proinflammatory process, as it facilitates neutrophil infiltration and elevates levels of proinflammatory cytokine as TNF- α [134,135].

The transcription factor NF- κ B plays a fundamental role in the UC pathogenesis by regulating the expression of cytokines [136], as in carcinogenesis as we have seen above. Intercellular adhesion molecule-1 (*ICAM-1*) and *TNF- α* gene promoters have binding sites for NF- κ B [137]. 8-oxo-7 β -dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) in the rectal mucosa may be another useful biomarker for detecting patients with UC-associated neoplasia [138].

An important event in the UC is the increased intestinal permeability which occurs by a decline in expression of a tight junction protein (occluding) mediated by a Th2 cytokine: IL-13 [139]. This increased permeability, in the case of animal models of dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis is accompanied by an increase in plasma levels of LPS [140], which is an indirect marker of gut bacteria in the systemic circulation [141].

It is known that there is a direct relationship between the UC and colon cancer; the duration of UC is proportional to the risk of suffering this kind of tumor [142]. The use of antioxidants in UC treatment may, therefore, prove interesting. Some authors have tested the role of MLT in this disease. Table 2 lists the obtained results and the impact caused by the administration of MLT in UC different models.

Table 2. Results and effects achieve with the administration of MLT in different animal models of induced UC by different chemical agents.

Study	Colitis Model	Results	Effects
Trivedi and Jena [143]	Dextran sulphate sodium (DSS) induced colitis	↓ Colon length observed in mice with UC	Increase intestinal surface
		↓ Levels of inflammatory markers: MPO, IL-17, IL-6, TNF- α , NF- κ B, COX-2, STAT3	Anti-inflammatory at the systemic site
		↑ Nrf2, NQO-1 and GSH	↓ Oxidative stress involved in UC
		Antifibrotic effect: ↓ MMP-9 and CTGF	Decrease in the loss of function of intestinal tissue
		↓ 8-Oxo-de expression	↓ Oxidative DNA damage
		↓ Occluding expression	↓ Elevated gut permeability
		↓ LPS plasma levels	↓ Gut bacteria in the systemic circulation
Li <i>et al.</i> [144]	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis	↓ mRNA levels for TNF- α and ICAM-1 colon tissues	↓ Colitis symptoms: rectal bleeding and occult blood and ↓ frequency and severity of mucosa damage dramatically
		↓ NF- κ B-DNA translocation and mRNA expression by ↑ I κ B α	↓ Expression of inflammatory cytokines
		↓ Inflammatory infiltrate of neutrophils, lymphocytes, and macrophages	↓ Severity of mucosa injury and alleviate colitis symptoms
Trivedi <i>et al.</i> [145]	1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) and DSS induced colitis-associated colon carcinogenesis (CACC)	↓ Tumor multiplicity, significantly ↓ in number of aberrant and abnormal crypts in the colon	Ameliorative effect on the progression of colon carcinogenesis
		Significantly ↓ levels of inflammatory markers: MPO, IL-17, IL-6, TNF- α	Anti-inflammatory effect
		Significantly ↓ in NF- κ B, COX-2, and STAT3 levels in the colon of mice with CACC	
		Significant ↓ TBARS and ↑ GSH levels in the colon	Antioxidant effect
		Significantly ↓ autophagy as revealed from the expression pattern of Beclin1, LC3-II/LC3-I ratio, and p62	↓ Autophagy in the colon of mice with CACC
		Significant ↑ Nrf2, NQO-1, and HO-1	↓ Oxidative stress
		↓ CACC-associated DNA damage as well as oxidative DNA damage in the colon of mice	Protective role in CACC

Table 2. Cont.

Study	Colitis Model	Results	Effects
Tahan <i>et al.</i> [146]	Acetic acid-induced colitis	Significant ↓ TNF- α , IL-1 β , IL-6, myeloperoxidase (MPO), and malondialdehyde (MDA) levels	Anti-inflammatory effect
		Significant ↑ GSH and SOD levels	Antioxidant effect
		Significant ↓ macro and microscopic lesion scores of the UC group	Protective role in UC
Sayyed <i>et al.</i> [147]	Acetic acid-induced colitis	↓ NF- κ B immuno histochemical expression	Anti-inflammatory effect
		↓ LP Levels	↓ Intestinal permeability
		↓ PTX3 Levels	↓ Neutrophil infiltration and proinflammatory Cytokines
Dong <i>et al.</i> [148]	Acetic acid or 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis	↓ Severity of gut injury and significantly ↓ of colon mucosal damage index (CMDI)	Protective role in UC
		Significantly ↓ of NO content and iNOS expression in colonic tissue	Antioxidant effect
		↓ PGE2 and expression of COX-2	Anti-inflammatory effect

UC, ulcerative colitis; MPO, myeloperoxidase; IL-17, interleukin 17; IL-6, interleukin 6; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; NF- κ B, nuclear factor κ -B; COX-2, cyclooxygenase-2; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; NQO-1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; GSH, glutathione; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; CTGF, connective tissue growth factor; LPS, lipopolysaccharide; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; CACC, colitis-associated colon carcinogenesis; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; HO-1, heme oxygenase 1; SOD, superoxide dismutase; LP, lipid peroxides; PTX3, Pentraxin 3; ↓, means reduction; ↑, means augmentation.

All these studies with animal models of UC show that MLT plays an important role improving the disease through multiple mechanisms of action, based on recognized antioxidant and anti-inflammatory capacity. Among other effects, MLT decreased tumor incidence, multiplicity, number of aberrant crypts per focus, and improved the histological profile or colonic lesions of mice with UC. MLT inhibited oxidant damage and inflammatory cytokines. MLT caused the decrease of colonic NO and PGE2 content, as well as the down-regulated expression of colonic iNOS and COX-2.

Besides experimental animal studies, there are data about MLT effects in human UC. Chojnaki *et al.* [149] carried out a clinical trial, in which four parameters were measured: Mayo Clinic disease activity index (MCDAI) (which took into account stool frequency, rectal bleeding, endoscopic findings, and physician's global assessment), CPR plasma levels, hemoglobin plasma levels, and anxiety (according to Hamilton anxiety scale). Results, with a dose of 5 mg at bedtime, were positive for all parameters. This makes MLT to be a suitable candidate for the treatment of UC.

9. Role of Melatonin in Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disorder [150]. It is considered an autoimmune disease given the presence of autoantibodies as rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) [151,152]. These antibodies are involved in proinflammatory cytokine production *in vitro*, which in turn is known to be associated with systemic inflammation and RA [153]. As in other autoimmune and inflammatory diseases, the chronicity results in destruction of synovial joints due to

continuous immune cell infiltration into the synovium [154]. RA is a disabling disease and has high rates of premature mortality [155].

Since RA is an inflammatory disease, key markers and molecules whose levels are increased and involved in RA pathogenesis are, among others, TLR3 and of IL-1 β in CD34+ cells, CRP, fibrinogen [156], ROS, MnSOD mRNA, NOX2 mRNA [157], PTX3, which is related to other cardiovascular diseases [158], or anti-IgG4 hinge antibodies that may represent one mechanism of ACPA-mediated inflammation [159].

Oxidative stress plays a key role in RA. It has been reported that RA patients have higher antioxidant levels than healthy controls, but they are insufficient to prevent oxidative damage [160]. Some authors have demonstrated that there are increased levels of NO in RA patients' serum, NO correlates significantly with disease activity, inflammatory markers and radiological joint status [161].

Given the profile of the disease, it is interesting to review what role MLT could play due to its antioxidant and anti-inflammatory activity. However, we found a double approach. Some authors defend the role of MLT as an adjuvant in the treatment of RA, but a substantial majority takes the view the MLT is implicated in the pathogenesis of the disease. Let us see the arguments for both.

Georges *et al.* reported that RA patients have higher nocturnal plasma levels of MLT than healthy controls. Additionally, they reported that MLT is present in the synovial fluid of RA patients and synovial macrophages have a specific binding site [162]. In another study we found strong indications about how MLT would be involved in modulation of immune responses by inducing the production and secretion of cytokines, such as IL-12 and NO production, too, by the involvement of synovial macrophages and human monocytic myeloid THP-1 cells. This leads us to believe that synovial arthritis' symptomatology in RA may be related with ROS, produced by monocyte and macrophages, cytokines and diurnal rhythmicity of neuroendocrine pathways [163]. There are even authors who have evidence of the potential mediators in the role of MLT-mediated arthritis [164,165].

The arguments in favor are less numerous and are based on the antioxidant properties of this molecule. Forrest *et al.* used MLT as an adjuvant in RA therapy, but they did not find enough evidence of positive effects of MLT in RA [166]. Maestroni *et al.* discovered that MLT did not worsen RA progression [167].

It seems that it is becoming increasingly clear, the enhancing role of MLT in the pathogenesis of RA, contrary to what might be expected. Studies supporting this theory are more recent. As we have seen, there are theories about the mechanism of action involving the MLT in the pathogenesis of this disease; some point to those synovial macrophages responding to MLT with an increased cytokine production [168].

10. Conclusions

As we have seen throughout this review, MLT is involved in the inhibition of numerous pathways of numerous mediators of inflammation. They arise from oxidative stress or oxidative damage by both endogenous and exogenous molecules. Nowadays, in the age that antioxidants are in the spotlight as a possible solution to emerging diseases in the first world, which are directly related to oxidative stress and inflammation, MLT is in the running as a candidate in the form of monotherapy or as an adjuvant to other therapeutic agents. The only exception seems to be the pathogenesis of rheumatoid arthritis which must be more deeply investigated to elucidate the real mechanisms involving MLT.

Finally, note that the antioxidant and anti-inflammatory potential of MLT encourages us to study the possible use of this molecule, or its derivatives, as an adjuvant in more aggressive therapies, or to

minimize side effects associated with oxidative and inflammatory damage of certain medicines, which opens a very large field of study.

Author Contributions

All authors contributed equally to the realization of this work.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cadenas, E.; Davies, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 222–230.
2. Moniczewski, A.; Gawlik, M.; Smaga, I.; Niedzielska, E.; Krzek, J.; Przegaliński, E.; Pera, J.; Filip, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 560–568.
3. Nathan, C. Specificity of a third kind: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signalling. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 769–778.
4. Halliwell, B. Reactive Oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 14–22.
5. Kelley, E.E.; Khoo, N.K.H.H.; Hundley, N.J.; Malik, U.Z.; Freeman, B.A.; Tarpey, M.M. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 493–498.
6. Mc Cord, J. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 652–659.
7. Hartman, K.G.; Bortner, J.D.; Falk, G.W.; Yu, J.; Martín, M.G.; Rustgi, A.K.; Lynch, J.P. Modeling inflammation and oxidative stress in gastrointestinal disease development using novel organotypic culture systems. *Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 1–5.
8. Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2381–2386.
9. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84.
10. Baird, L.; Dinkova-Kostova, A.T. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 241–272.
11. Buelna-Chontal, M.; Zazueta, C. Redox activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword? *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2548–2557.
12. Naik, E.; Dixit, V.M. Mitochondrial reactive oxygen species drive pro-inflammatory cytokine production. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 417–420.

13. Lee, K.M.; Kang, B.S.; Lee, H.L.; Son, S.J.; Hwang, S.H.; Kim, D.S.; Park, J.S.; Cho, H.J. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 3375–3381.
14. Yadav, U.; Ramana, K.V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *690545*, 1–11.
15. Ohnishi, S.; Ma, N.; Thanan, R.; Pinlaor, S.; Hammam, O.; Murata, M.; Kawanishi, S. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *387014*, 1–9.
16. Aderem, A.; Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **2000**, *406*, 782–787.
17. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, *1*, 135–145.
18. Babatunji, E.O.; Abiola, F.A.; Abidemi, P.K. Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 151–175.
19. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616.
20. Smaga, I.; Niedzielska, E.; Gawlik, M.; Moniczewski, A.; Krzek, J.; Przegalin, E.; Pera, J.; Filip, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 569–580.
21. Simoncini, C.; Orsucci, D.; Caldarazzo, E.; Siciliano, G.; Bonuccelli, U.; Mancuso, M. Alzheimer's pathogenesis and its link to the mitochondrion. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *803942*, 1–8.
22. Golpich, M.; Amini, E.; Hemmati, F.; Ibrahim, N.M.; Rahmani, B.; Mohamed, Z.; Raymond, A.A.; Dargahi, L.; Ghasemi, R.; Ahmadiani, A. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* **2008**, *97*, 16–26.
23. Ansari, M.A.; Roberts, K.N.; Scheff, S.W. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 443–452.
24. Hawa, N.S.; Kamisah, Y.; Kamsiah, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vasc. Pharmacol.* **2015**, doi:10.1016/j.vph.2015.03.005.
25. Pickup, J.C. Inflammation and activate innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 813–823.
26. D'Aiuto, F.; Nibali, L.; Parkar, M.; Patel, K.; Suvan, J.; Donos, N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 1241–1246.
27. Tucker, P.; Scanlan, A.; Dalbo, V.J. Chronic kidney disease influences multiple systems: Describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *806358*, 1–8.
28. Piechota-Polanczyk, A.; Fichna, J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2014**, *387*, 605–620.
29. Mahad, D.H.; Trapp, B.D.; Lassmann, H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 183–193.

30. Park, Y.J.; Yoo, S.A.; Kim, W.U. Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. *J. Korean Med. Sci.* **2014**, *29*, 2–11.
31. Balasubramanian, V. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World J. Hepatol.* **2015**, *27*, 443–459.
32. Sánchez-Domínguez, B.; Bullón, P.; Román-Malo, L.; Marín-Aguilar, F.; Alcocer-Gómez, E.; Carrión, A.M.; Sánchez-Alcazar, J.A.; Cordero, M.D. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. *Mitochondrion* **2015**, *21*, 69–75.
33. Wallace, D.J.; Linker-Israeli, M.; Hallegua, D.; Silverman, S.; Silver, D.; Weisman, M.H. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: A hypothesis and pilot study. *Rheumatology* **2001**, *40*, 473–479.
34. Macchi, M.M.; Bruce, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrinol.* **2004**, *25*, 177–195.
35. Lerner, A.B.; Case, J.D.; Takahashi, Y. Isolation of melatonin and 5- methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1992–1997.
36. Klein, D.C.; Moore, R.Y. Pineal *N*-acetyltransferase and hydroxyindole-*O*-methyltransferase: Control by the retinohy-pothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **1979**, *174*, 245–262.
37. Axelrod, J.; Weissbach, H. Enzymatic *O*-methylation of *N*- acetylserotonin to melatonin. *Science* **1960**, *131*, 1312–1312.
38. Reiter, R.J.; Paredes, S.D.; Manchester, L.C.; Tan, D.X. Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly-discovered genre for melatonin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44*, 175–200.
39. Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Terron, M.P.; Flores, L.J.; Reiter, R.J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* **2007**, *42*, 28–42.
40. Dragicevic, N.; Copes, N.; O’Neal-Moffitt, G.; Jin, J.; Buzzeo, R.; Mamcarz, M.; Tan, J.; Cao, C.; Olcese, J.M.; Arendash, G.W.; *et al.* Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer’s mice: A mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 75–86.
41. Malhotra, S.; Sawhney, G.; Pandhi, P. The therapeutic potential of melatonin: A review of the science. *Med. Gen. Med.* **2004**, *6*, 46.
42. Arendt, J. Safety of melatonin in long-term use. *J. Biol. Rhythm.* **1997**, *12*, 673–681.
43. Schernhammer, E.S.; Giobbie-Hurder, A.; Gantman, K.; Savoie, J.; Scheib, R.; Parker, L.M.; Chen, W.Y. A randomized controlled trial of oral melatonin supplementation and breast cancer biomarkers. *Cancer Causes Control* **2012**, *23*, 609–616.
44. Luboshitzky, R.; Shen-Orr, Z.; Nave, R.; Lavi, S.; Lavie, P. Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *J. Androl.* **2002**, *23*, 572–578.
45. Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436–444.
46. Karin, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* **2006**, *441*, 431–436.
47. Gilmore, T.D. Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene* **2006**, *25*, 6680–6684.

48. Brasier, A.R. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* **2006**, *6*, 111–130.
49. Morgan, M.J.; Liu, Z.G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* **2011**, *21*, 103–115.
50. Taniguchi, K.; Karin, M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 54–74.
51. Vlachostergios, P.J.; Papandreou, C.N. The Bmi-1/NF- κ B/VEGF story: Another hint for proteasome involvement in glioma angiogenesis? *J. Cell Commun. Signal.* **2013**, *7*, 235–237.
52. Steagall, R.J.; Daniels, C.R.; Dalal, S.; Joyner, W.L.; Singh, M.; Singh, K. Extracellular ubiquitin increases expression of angiogenic molecules and stimulates angiogenesis in cardiac microvascular endothelial cells. *Microcirculation* **2013**, *21*, 324–332.
53. Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Kasuya, Y.; Miyachi, T.; Goto, K.; Masaki, T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2863–2867.
54. Kedzierski, R.; Yanagisawa, M. Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 851–876.
55. Grant, K.; Loizidou, M.; Taylor, I. Endothelin-1: A multi-functional molecule in cancer. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 163–166.
56. Rosano, L.; Spinella, F.; Bagnato, A. Endothelin 1 in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 637–651.
57. Stow, L.R.; Jacobs, M.E.; Wingo, C.S.; Cain, B.D. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J.* **2011**, *25*, 16–28.
58. Leon, J.; Casado, J.; Sergio, M.; Jimenez Ruiz, S.M.; Zurita, M.S.; Gonzalez-Puga, C.; Rejon, J.D.; Gila, A.; Muñoz de Rueda, P.; Pavón, E.J.; *et al.* Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF- κ B. *J. Pineal Res.* **2014**, *56*, 415–426.
59. Dai, M.; Cui, P.; Yu, M.; Han, J.; Li, H.; Xiu, R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. *J. Pineal Res.* **2008**, *44*, 121–126.
60. Bruick, R.K.; Mcknight, S.L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **2001**, *294*, 1337–1340.
61. Haddadi, G.H.; Fardid, R. Oral administration of melatonin modulates the expression of tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) gene in irradiated rat cervical spinal cord. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2015**, *20*, 123–127.
62. Farriol, M.; Venereo, Y.; Orta, X.; Castellanos, J.M.; Segovia-Silvestre, T. *In vitro* effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J. Appl. Toxicol.* **2000**, *20*, 21–24.
63. Leon-Blanco, M.M.; Guerrero, J.M.; Reiter, R.J.; Calvo, J.R.; Pozo, D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both *in vivo* and *in vitro*. *J. Pineal Res.* **2003**, *35*, 204–211.
64. Blask, D.E.; Dauchy, R.T.; Sauer, L.A.; Krause, J.A. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288 CTC in response to dietary melatonin: Melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxydecaenoic acid and the potential role of phytomelatonin. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 951–960.

65. Padillo, F.J.; Ruiz-Rabelo, J.F.; Cruz, A.; Perea, M.D.; Tasset, I.; Montilla, P. Melatonin and celecoxib improve the outcomes in hamsters with experimental pancreatic cancer. *J. Pineal Res.* **2010**, *49*, 264–270.
66. Ruiz-Rabelo, J.; Vázquez, R.; Arjona, A.; Perea, D.; Montilla, P.; Túnez, I. Improvement of capecitabine antitumoral activity by melatonin in pancreatic cancer. *Pancreas* **2011**, *40*, 410–414.
67. Ruiz-Rabelo, J.F.; Vázquez, R.; Perea, M.D.; Cruz, A.; González, R.; Romero, A. Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer. *J. Pineal Res.* **2007**, *43*, 270–275.
68. Lissoni, P.; Chillelli, M.; Villa, S.; Cerizza, L.; Tancini, G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. *J. Pineal Res.* **2003**, *35*, 12–15.
69. Lissoni, P.; Rovelli, F.; Malugani, F.; Bucovec, R.; Conti, A.; Maestroni, G.J. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol. Lett.* **2001**, *22*, 45–47.
70. Todisco, M. Chronic lymphocytic leukemia: Long-lasting remission with combination of cyclophosphamide, somatostatin, bromocriptine, retinoids, melatonin, and ACTH. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 353–355.
71. Lissoni, P.; Vaghi, M.; Ardizzoia, A.; Malugani, F.; Fumagalli, E.; Bordin, V.; Fumagalli, L.; Bordoni, A.; Mengo, S.; Gardani, G.S.; *et al.* A phase II study of chemoneuroimmunotherapy with platinum, subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal neurohormone melatonin (P.I.M.) as a second-line therapy in metastatic melanoma patients progressing on dacarbazine plus interferon- α . *In Vivo* **2002**, *16*, 93–96.
72. Todisco, M.; Casaccia, P.; Rossi, N. Cyclophosphamide plus somatostatin, bromocriptin, retinoids, melatonin and ACTH in the treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas at advanced stage: Results of a phase II trial. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2001**, *16*, 171–177.
73. Lissoni, P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol. Biol.* **2007**, *51*, 201–204.
74. Lissoni, P.; Barni, S.; Mandalà, M.; Ardizzoia, A. Paolorossi, F.; Vaghi, M.; Longarini, R. Malugani, F.; Tancini, G. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 1688–1692.
75. Lissoni, P.; Brivio, O.; Brivio, F.; Barni, S.; Tancini, G.; Crippa, D.; Meregalli, S. Adjuvant therapy with the pineal hormone melatonin in patients with lymph node relapse due to malignant melanoma. *J. Pineal Res.* **1996**, *21*, 239–342.
76. Flo, A.; Flo, V.; Calpena, A.C.; Clares, B. The role of antioxidant in sunscreens: The case of melatonin. In *Sunscreens. Properties, Role in Skin Cancer Prevention and Health Effects*; Sharp, S.H., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA, 2015; pp. 39–76.
77. Bald, T.; Quast, T.; Landsberg, J.; Rogava, M.; Glodde, N.; Lopez-Ramos, D.; Kohlmeyer, J.; Riesenberg, S.; van den Boorn-Konijnenberg, D.; Hömig-Hölzel, C.; *et al.* Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* **2014**, *507*, 109–113.

78. Scheuer, C.; Pommergaard, H.C.; Rosenberg, J.; Gögenur, I. Melatonin's protective effect against UV radiation: A systematic review of clinical and experimental studies. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2014**, *30*, 180–188.
79. Sierra, A.F.; Ramírez, M.L.; Campmany, A.C.; Martínez, A.R.; Naveros, B.C. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.* **2013**, *69*, 202–214.
80. Offenbacher, S. Periodontal diseases: Pathogenesis. *Ann. Periodontol.* **1996**, *1*, 821–878.
81. Smalley, J.W. Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* **1994**, *8*, 320–328.
82. World Health Organization (WHO). Oral Health. Fact Sheet N° 318. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/> (accessed on 11 July 2015).
83. Scardina, G.A.; Messina, P. Good oral health and diet. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *720692*, 1–8.
84. Madani, A.H.; Dikshit, M.; Bhaduri, D.; Aghamolaei, T.; Moosavy, S.H.; Azarpaykan, A. Interaction of alcohol use and specific types of smoking on the development of oral cancer. *Int. J. High Risk Behav. Addict.* **2014**, *1*, 2120–2120.
85. Macfarlane, G.J.; Zheng, T.; Marshall, J.R.; Boffetta, P.; Niu, S.; Brasure, J.; Merletti, F.; Boyle, P. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: A pooled analysis of three case-control studies. *Eur. J. Cancer B* **1995**, *31*, 181–187.
86. Moreno-López, L.A.; Esparza-Gómez, G.C.; González-Navarro, A.; Cerero-Lapiedra, R.; González-Hernández, M.J.; Domínguez-Rojas, V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: A case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol.* **2000**, *36*, 170–174.
87. Preshaw, P.M.; Bissett, S.M. Periodontitis: Oral complication of diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2013**, *42*, 849–867.
88. Irani, F.C.; Wassall, R.R.; Preshaw, P.M. Impact of periodontal status on oral health-related quality of life in patients with and without type 2 diabetes. *J. Dent.* **2015**, *43*, 506–511.
89. Gustafsson, A.; Asman, B. Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fe δ -receptor stimulation. *J. Clin. Periodontol.* **1996**, *23*, 38–44.
90. Waddington, R.J.; Moseley, R.; Embery, G. Reactive oxygen species: A potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* **2000**, *6*, 138–151.
91. Avezov, K.; Reznick, A.; Aizenbud, D. Oxidative stress in the oral cavity: Sources and pathological outcomes. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2015**, *209*, 91–94.
92. Firatli, E.; Unal, T.; Onan, U. Antioxidant activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J. Clin. Periodontol.* **1994**, *21*, 680–683.
93. Blasiak, J.; Kasznicki, J.; Drzewoski, J.; Pawlowska, E.; Szczepanska, J.; Reiter, R.J. Perspectives on the use of melatonin to reduce cytotoxic and genotoxic effects of methacrylate-based dental materials. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 157–162.
94. Gomez-Moreno, G.; Guardia, J.; Ferrera, M.J.; Cutando, A.; Reiter, R.J. Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Dis.* **2010**, *16*, 242–247.
95. Cutando, A.; Gomez-Moreno, G.; Arana, C.; Acuna-Castroviejo, D.; Reiter, R.J. Melatonin: Potential functions in the oral cavity. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 1094–1102.
96. Almughrabi, O.M.; Marzouk, K.M.; Hasanato, R.M.; Shafik, S.S. Melatonin levels in periodontal health and disease. *J. Periodontal Res.* **2013**, *48*, 315–321.

97. Srinath, R.; Acharya, A.B.; Thakur, S.L. Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 277–283.
98. Gómez-Moreno, G.; Cutando-Soriano, A.; Arana, C.; Galindo, P.; Bolaños, J.; Acuña-Castroviejo, D. Melatonin expression in periodontal disease. *J. Periodontal Res.* **2007**, *42*, 536–540.
99. Mutoh, N.; Tani-Ishii, N.; Tsukinoki, K.; Chieda, K.; Watanabe, K. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *J. Endod.* **2007**, *33*, 1183–1186.
100. Liu, T.; Gao, Y.J.; Ji, R.R. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neurosci. Bull.* **2012**, *28*, 131–144.
101. Ji-Guo, L.; Jia-Ji, L.; Zhao-Ling, W.; Wen-Ke, C.; Pei-Na, W.; Qian, J.; An-Sheng, Z.; Gao-Yi, W.; Guo-Xiong, Z.; Long-Xing, N. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 66–78.
102. Adem, K.; Sumeyra, A.; Seckin, O.; Ummuhan, T.; Yıldırım, K.; Cenk, F.C.; Sinan, T. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *55*, 21–26.
103. Gomez-Florit, M.; Ramis, J.M.; Monjo, M. Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 1784–1790.
104. Nakade, O.; Koyama, H.; Ariji, H.; Yajima, A.; Kaku, T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. *J. Pineal Res.* **1999**, *27*, 106–110.
105. Kao, M.P.C.; Ang, D.S.C.; Pall, A.; Struthers, A.D. Oxidative stress in renal dysfunction: Mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J. Hum. Hypertens.* **2010**, *24*, 1–8.
106. Avery, S.V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* **2011**, *434*, 201–210.
107. Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **1997**, *33*, 20313–20316.
108. Halliwell, B.; Chirico, S.; Crawford, M.A.; Bjerve, K.S.; Gey, K.F. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 715S–724S.
109. Evans, M.D.; Dizdaroglu, M.; Cooke, M.S. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutat. Res.* **2004**, *567*, 1–61.
110. Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1195–1214.
111. Turrens, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **1997**, *17*, 3–8.
112. Kurcer, Z.E.; Oguz, H.; Ozbilge, F.; Baba, N.; Aksoy, H.; Celik, H.; Cakir, H.; Gezen, M.R. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: This effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J. Pineal Res.* **2007**, *36*, 172–178.
113. Abraham, P.; Kolli, V.K.; Rabi, S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Biochem. Funct.* **2010**, *28*, 426–433.
114. Hara, M.; Yoshida, M.; Nishijima, H.; Yokosuka, M.; Ligo, M.; Ohtani-Kaneko, R.; Shimada, A.; Hasegawa, T.; Akama, Y.; Hirata, K. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal Res.* **2001**, *30*, 129–138.
115. Guan, X.; Dei-Anane, G.; Liang, R. Donor preconditioning with taurine protects kidney grafts from injury after experimental transplantation. *J. Surg. Res.* **2008**, *146*, 127–134.

116. Lemasters, J.J.; Thurman, R.G. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 327–338.
117. Li, Z.; Nickkholgh, A.; Yi, X.; Bruns, H.; Gross, M.L.; Hoffmann, K.; Mohr, E.; Zorn, M.; Büchler, M.W.; Schemmer, P. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J. Pineal Res.* **2009**, *46*, 365–372.
118. Bennett, R.M.; Jones, J.; Turk, D.C.; Russell, I.J.; Matallana, L. An internet survey of 2596 people with fibromyalgia. *BMC Musculoskelet. Dis.* **2007**, *8*, 27.
119. Kalyan-Raman, U.P.; Kalyan-Raman, K.; Yunus, M.B. Muscle pathology in primary fibromyalgia syndrome: A light microscopic, histochemical and ultrastructural study. *J. Rheumatol.* **1984**, *11*, 808–813.
120. Lucas, H.J.; Brauch, C.M.; Settas, L. Fibromyalgia—New concepts of pathogenesis and treatment. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2006**, *19*, 5–10.
121. De Zanette, S.A.; Vercelino, R.; Laste, G.; Rozisky, J.R.; Schwertner, A.; Machado, C.B.; Xavier, F.; Custódio de Souza, I.C.; Deitos, A.; Torres, I.L.S.; *et al.* Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *15*, 1–14.
122. Hussain, S.A.; Al-Khalifa, I.I.; Jasim, N.A.; Gorial, F.I. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 267–271.
123. Hanauer, S.B. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12*, 3–9.
124. Geboes, K. Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis—How important is it to differentiate? *Acta Gastroenterol. Belg.* **2001**, *64*, 197–200.
125. Sartor, R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *3*, 390–407.
126. Danese, S.; Fiocchi, C. Ulcerative colitis. *Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1713–1725.
127. Williams, D.R.; Collier, J.A.; Corman, M.L.; Nugent, F.W.; Veidenheimer, M.C. Anal complications in Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum* **1981**, *24*, 22–24.
128. Plauth, M.; Jenss, H.; Meyle, J. Oral manifestations of Crohn's disease: An analysis of 79 cases. *J. Clin. Gastroenterol.* **1991**, *13*, 29–37.
129. Seril, D.N.; Liao, J.; Yang, G.Y.; Yang, C.S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: Studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 353–362.
130. Boldeanu, M.V.; Siloși, I.; Ghiluși, M.; Cojocaru, M.; Biciușcă, B.; Avrămescu, C.S.; Cojocaru, I.M.; Ciurea, T.; Albu, D.F.; Siloși, C.A. Investigation of inflammatory activity in ulcerative colitis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2014**, *55*, 1345–1351.
131. Radema, S.A.; van Deventer S.J.; Cerami, A. Interleukin-1 β is expressed predominantly by enterocytes in experimental colitis. *Gastroenterology* **1991**, *100*, 1180–1186.
132. Sakamoto, C. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J. Gastroenterol.* **1998**, *33*, 618–624.
133. Savchenko, A.S.; Inoue, A.; Ohashi, R. Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils *in vitro* and in ulcerative colitis. *Pathol. Int.* **2011**, *61*, 290–297.

134. Souza, D.G.; Amaral, F.A.; Fagundes, C.T.; Coelho, F.M.; Arantes, R.M.; Sousa, L.P. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 1309–1318.
135. Bottazzi, B.; Garlanda, C.; Salvatori, G. Jeannin, P.; Manfredi, A.; Mantovani, A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 10–15.
136. Gan, H.; Ouyang, Q.; Jia, D.; Xia, Q. Activation of nuclear factor- κ B and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Chin. J. Int. Med.* **2002**, *41*, 252–255.
137. Jobin, C.; Hellerbrand, C.; Licato, L.L.; Brenner, D.A.; Sartor, R.B. Mediation by NF- κ B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* **1998**, *42*, 779–787.
138. Saigusa, S.; Araki, T.; Tanaka, K.; Hashimoto, K.; Okita, Y.; Fujikawa, H.; Okugawa, Y.; Toiyama, Y.; Inoue, Y.; Uchida, K.; *et al.* Identification of patients with developing ulcerative colitis-associated neoplasia by nitrative DNA damage marker 8-nitroguanine expression in rectal mucosa. *J. Clin. Gastroenterol.* **2013**, *47*, 80–86.
139. Heller, F.; Florian, P.; Bojarski, C.; Richter, J.; Christ, M.; Hillenbrand, B.; Schulzke, J.D. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 550–564.
140. Gäbele, E.; Dostert, K.; Hofmann, C.; Wiest, R.; Schölmerich, J.; Hellerbrand, C.; Obermeier, F. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 1391–1399.
141. Bellot, P.; Francés, R.; Such, J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: Pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* **2013**, *33*, 31–39.
142. Jess, T.; Rungoe, C.; Peyrin-Biroulet, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of population based cohort studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *10*, 639–645.
143. Trivedi, P.P.; Jena, G.B. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: Investigation on possible mechanisms. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 3460–3474.
144. Li, J.H.; Yu, J.P.; Yu, H.G.; Xu, X.M.; Yu, L.L.; Liu, J.; Luo, H.S. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF- κ B activation in rats with colitis. *Mediat. Inflamm.* **2005**, *4*, 185–193.
145. Trivedi, P.P.; Jena, G.B.; Kumar, V. Melatonin modulated autophagy and Nrf2 signaling pathways in mice with colitis-associated colon carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **2015**, doi:10.1002/mc.22274.
146. Tahan, G.; Gramignoli, R.; Marongiu, F.; Aktolga, S.; Cetinkaya, A.; Tahan, V.; Dorko, K. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* **2011**, *56*, 715–720.
147. Sayyed, H.G.; Jaumdally, R.J.; Idriss, N.K.; Dalia, A.; Blann, A. The effect of melatonin on plasma markers of inflammation and on expression of nuclear factor- κ β in acetic acid-induced colitis in the rat. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 3156–3164.
148. Dong, W.G.; Mei, Q.; Yu, J.P.; Xu, J.M.; Xiang, L.; Xu, Y. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 1307–1311.
149. Chojnacki, C.; Wisniewska-jarosinska, M.; Walecka-kapica, E.; Klupinska, G.; Jaworek, J.; Chojnacki, J. Evaluation of melatonin effectiveness in the adjuvant treatment of ulcerative colitis. *J. Physiol. Pharmacol.* **2011**, *62*, 327–334.

150. Klareskog, L.; Catrina, A.I.; Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **2009**, *373*, 659–672.
151. Aho, K.; von Essen, R.; Kurki, P.; Palosuo, T.; Heliovaara, M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J. Rheumatol.* **1993**, *20*, 1278–1281.
152. Nielen, M.M.; van Schaardenburg, D.; Reesink, H.W.; van de Stadt, R.J.; van der Horst-Bruinsma, I.E.; de Koning, M.H.; Habibuw, M.R.; Vandenbroucke, J.P.; Dijkmans, B.A. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 380–386.
153. Sokolove, J.; Johnson, D.S.; Lahey, L.J.; Wagner, C.A.; Cheng, D.; Thiele, G.M.; Michaud, K.; Sayles, H.; Reimold, A.M.; Caplan, L.; *et al.* Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **2014**, *66*, 813–821.
154. Isomaki, H. Long-term outcome of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **1992**, *95*, 3–8.
155. Pincus, T.; Callahan, L.F.; Sale, W.G.; Brooks, A.L.; Payne, L.E.; Vaughn, W.K. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum.* **1984**, *27*, 864–872.
156. Lo Gullo, A.; Mandraffino, G.; Imbalzano, E.; Mamone, F.; Aragona, C.O.; D’Ascola, A.; Loddo, S.; Cinquegrani, A.; Alibrandi, A.; Mormina, E.; *et al.* Toll-like receptor 3 and interleukin 1 β expression in CD34+ cells from patients with rheumatoid arthritis: association with inflammation and vascular involvement. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2014**, *32*, 922–929.
157. Lo Gullo, A.; Mandraffino, G.; Sardo, M.A.; D’Ascola, A.; Mamone, F.; Loddo, S.; Alibrandi, A.; Imbalzano, E.; Mandraffino, R.; Mormina, E.; *et al.* Circulating progenitor cells in rheumatoid arthritis: Association with inflammation and oxidative stress. *Scand. J. Rheumatol.* **2014**, *43*, 184–193.
158. Hollan, I.; Nebuloni, M.; Bottazzi, B.; Mikkelsen, K.; Førre, O.T.; Almdahl, S.M.; Mantovani, A.; Fagerland, M.W.; Aukrust, P.; Meroni, P.L. Feiring Heart Biopsy Study Group. Pentraxin 3, a novel cardiovascular biomarker, is expressed in aortic specimens of patients with coronary artery disease with and without rheumatoid arthritis. *Cardiovasc. Pathol.* **2013**, *22*, 324–331.
159. Van de Stadt, L.A.; de Vriese, H.; Derksen, N.I.; Brouwer, M.; Wouters, D.; van Schaardenburg, D.; Wolbink, G.; Rispen, T. Antibodies to IgG4 hinge can be found in rheumatoid arthritis patients during all stages of disease and may exacerbate chronic antibody-mediated inflammation. *Arthritis Rheum.* **2014**, *66*, 1133–1140.
160. García-González, A.; Gaxiola-Robles, R.; Zenteno-Savín, T. Oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Rev. Investig. Clin.* **2015**, *67*, 46–53.
161. Ali, A.M.; Habeeb, R.A.; El-Azizi, N.O.; Khattab, D.A.; Abo-Shady, R.A. Elkabarity, R.H. Higher nitric oxide levels are associated with disease activity in Egyptian rheumatoid arthritis patients. *Rev. Bras. Reumatol.* **2014**, *54*, 446–451.
162. Maestroni, G.J.; Sulli, A.; Pizzorni, C.; Villaggio, B.; Cutolo, M. Melatonin in rheumatoid arthritis: Synovial macrophages show melatonin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *966*, 271–275.
163. Cutolo, M.; Villaggio, B.; Candido, F.; Valenti, S.; Giusti, M.; Felli, L.; Sulli, A.; Accardo, S. Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP-1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *2*, 246–254.

164. Bang, J.; Chang, H.W.; Jung, H.R.; Cho, C.H.; Hur, J.A.; Lee, S.I.; Choi, T.H.; Kim, S.H. Melatonin attenuates *clock* gene *Cryptochrome1*, which may aggravates mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Reumathol. Int.* **2012**, *32*, 379–385.
165. Kalpakcioglu, B.; Senel, K. The role of melatonin in rheumatic diseases. *Infect. Disord. Drug Targets* **2009**, *9*, 453–456.
166. Forrest, C.M.; Mackay, G.M.; Stoy, N.; Stone, T.W.; Darlington, L.G. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *64*, 517–526.
167. Maestroni, G.J.; Otsa, K.; Cutolo, M. Melatonin treatment does not improve rheumatoid arthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *65*, 797–798.
168. Cardinali, D.P.; García, A.P.; Cano, P.; Esquifino, A.I. Melatonin role in experimental arthritis. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* **2004**, *4*, 1–10.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO II OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El perfil de seguridad de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) ha sido ampliamente estudiado y tanto los efectos terapéuticos como los efectos secundarios a nivel gastrointestinal (GI) y cardiovascular, se han asociado históricamente con el efecto inhibidor de los mismos sobre la COX-1 y la COX- 2 respectivamente. Este enfoque, en cuanto a efectos GI se refiere, ha quedado obsoleto, ya que ahora hay evidencias de la participación de múltiples vías celulares en el daño GI mediado por AINE y aunque no se conoce la secuencia exacta, dichas vías estarían relacionadas, entre otros, con el estado oxidativo o redox del enterocito.

Las terapias clásicas para evitar los daños GI se basan en el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP) que disminuyen la secreción ácida y aunque el pH ácido está directamente relacionado con el daño GI, ya que lo agrava, no se trata de la causa principal que genera los efectos GI secundarios de esta familia de medicamentos.

Además, la hipoclorhidria y aclorhidria se relacionan con un mayor riesgo de infecciones entéricas por diferentes microorganismos patógenos y diferentes estudios han identificado cambios profundos en el microbioma intestinal en pacientes tratados con IBP lo que según estudios recientes tendría implicaciones directas en el organismo y una repercusión mayor en el estado de salud de lo que se conocía.

Por otro lado, la melatonina ha demostrado ser un potente agente antioxidante, numerosos estudios avalan tanto su interacción directa con RL y moléculas oxidantes, como su efecto indirecto al activar otros sistemas enzimáticos de defensa contra el daño oxidativo.

Dadas las evidencias sobre la actividad antioxidante de la MLT, el **objetivo global planteado** en la presente tesis doctoral ha sido el estudio de la MLT como posible agente preventivo del daño GI inducido por los AINE.

Esta tesis está relacionada con diversas áreas de conocimiento, en primer lugar, con la **Biofarmacia y Farmacocinética**, necesarias para el desarrollo de un modelo *ex vivo* con el cual evaluar procesos de absorción intestinal. A través de este método puede evaluarse la permeabilidad de fármacos a través de intestino delgado, así como predecirse cambios en la misma. La **Histología y Biología celular** necesarias para la evaluación de lesiones en los distintos tejidos estudiados; por último, la **Bioquímica** para determinar niveles de marcadores celulares bioquímicos, que permitan dilucidar posibles mecanismos de acción involucrados en la prevención del daño GI mediado por la MLT.

Basado en lo anterior y con el fin de cumplir con el objetivo global, se diseñó el siguiente **plan de trabajo:**

Fase 1. Desarrollo y validación de un método o modelo ex vivo para la determinación de cinética de absorción y/o permeación intestinal y estudio de su correlación con células Caco-2.

1. Realizar una revisión bibliográfica de fármacos de cada una de las clases (I-IV) de la clasificación Biofarmacéutica, incluyendo la MLT.
2. Diseñar los experimentos de permeación *ex vivo* de acuerdo con las características de cada molécula.
3. Poner a punto y validar el método *ex vivo* de permeación intestinal.

Fase 2. Selección del modelo animal y de los marcadores bioquímicos más adecuados para evaluar la acción de la melatonina como agente preventivo del daño gastrointestinal.

1. Realizar una revisión bibliográfica para seleccionar el modelo animal más adecuado.
2. Realizar una revisión bibliográfica de la actividad de la MLT como antioxidante y su papel en distintas enfermedades para seleccionar los marcadores bioquímicos más adecuados.

Fase 3. Evaluación de la actividad de la melatonina como agente preventivo del daño gastrointestinal inducido por AINE.

3. Realizar una revisión bibliográfica para seleccionar el/los AINE más adecuados como modelo de daño gastrointestinal.
4. Realizar la evaluación de la MLT como agente preventivo del daño gastrointestinal inducido por AINE en un modelo *ex vivo*:
 - a. Estudio histológico del tejido animal del modelo *ex vivo* utilizado.
 - b. Estudio bioquímico del tejido animal del modelo *ex vivo* utilizado.
 - c. Estudio y comparación de la permeabilidad aparente del AINE solo y en presencia de la MLT usando el método validado en el punto 3.
5. Realizar la evaluación de la MLT como agente preventivo del daño gastrointestinal en un modelo *in vivo*.
 - a. Diseñar y desarrollar el estudio *in vivo* del modelo animal seleccionado.

- b. Estudio histológico del tejido animal del modelo *in vivo* utilizado.
- c. Estudio bioquímico del tejido animal del modelo *in vivo* utilizado.

CAPÍTULO III RESULTADOS

5. Artículo 2

Validation of an *Ex Vivo* Permeation Method for the Intestinal Permeability of Different BCS Drugs and its Correlation with Caco-2 *In Vitro* Experiments

(Validación de un método ex vivo de permeación intestinal para diferentes fármacos de la clasificación biofarmacéutica y su correlación con experimentos in vitro en Caco-2)

Autores: Aroha B. Sánchez, Ana C. Calpena, Mireia Mallandrich y Beatriz Clares

Pharmaceutics 2019; 11, 638

Índice de impacto: 4.773 (ISI Journal Citations Reports)

Categoría: Ciencias farmacéuticas (Q1)

Resumen

El estudio de absorción de fármacos constituye un paso esencial en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas. En cuanto a las formas orales, se han desarrollado métodos basados en cultivos celulares en monocapa Caco-2 (Células de Adenocarcinoma de Colon Humano) para emular la mucosa intestinal en estudios de permeabilidad. A pesar de ser un método ampliamente aceptado, el cultivo celular presenta ciertas desventajas relacionadas sobre todo con los costos, la alta complejidad técnica y necesidad de personal cualificado, además de limitaciones relacionadas con la monocapa de células que es una estructura más simple que el epitelio gastrointestinal y que limita la clase de moléculas que pueden ser permeadas según los mecanismos de transporte. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un nuevo método *ex vivo* que permite evaluar el coeficiente de permeabilidad aparente intestinal (P_{app}) empleando menos recursos y evaluar la correlación con las Caco-2. Para ello, se utilizó como membrana segmentos de duodeno de cerdo (*Sus scrofa*) que se montaron en células de Franz y se permearon cuatro fármacos diferentes: Ketorolaco trometamina (KT), MLT, hidroclorotiazida (HTZ) y furosemida (FUR). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) al correlacionar los valores de P_{app} obtenidos usando células de difusión de Franz y los valores obtenidos con células Caco-2 para KT, HTZ y FUR. Si hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al correlacionar los valores de P_{app} para ambas técnicas en el caso de la MLT. Esta diferencia se explica por el papel demostrado de la MLT en la reducción de la permeabilidad paracelular epitelial duodenal. Como conclusión, el método de permeación *ex vivo* usando intestino de cerdo puede considerarse un método equivalente a los ensayos en Caco-2 para aquellos fármacos que no producen fenómenos sobre la membrana intestinal que pueda afectar a la absorción.

Article

Validation of an Ex Vivo Permeation Method for the Intestinal Permeability of Different BCS Drugs and Its Correlation with Caco-2 In Vitro Experiments

Aroha B. Sánchez ¹, Ana C. Calpena ¹ , Mireia Mallandrich ¹ and Beatriz Clares ^{2,*} 

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; aroha_89_1@hotmail.com (A.B.S.); anacalpena@ub.edu (A.C.C.); mireia.mallandrich@ub.edu (M.M.)

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

* Correspondence: beatrizclares@ugr.es; Tel.: +34-958246664

Received: 21 October 2019; Accepted: 27 November 2019; Published: 29 November 2019



Abstract: The absorption study of drugs through different biological membranes constitutes an essential step in the development of new pharmaceutical dosage forms. Concerning orally administered forms, methods based on monolayer cell culture of Caco-2 (Caucasian colon adenocarcinoma) have been developed to emulate intestinal mucosa in permeability studies. Although it is widely accepted, it has disadvantages, such as high costs or high technical complexity, and limitations related to the simplified structure of the monolayer or the class of molecules that can be permeated according to the transport mechanisms. The aim of this work was to develop a new ex vivo methodology which allows the evaluation of the intestinal apparent permeability coefficient (P_{app}) while using fewer resources and to assess the correlation with Caco-2. To this end, pig (*Sus scrofa*) duodenum segments were mounted in Franz diffusion cells and used to permeate four different drugs: ketorolac tromethamine (Kt), melatonin (Mel), hydrochlorothiazide (Htz), and furosemide (Fur). No statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed correlating P_{app} values from Franz diffusion cells and Caco-2 cell experiments for Kt, Htz, and Fur. However, there were statistically significant differences ($p < 0.05$) correlating P_{app} values and Mel. The difference is explained by the role of Mel in the duodenal epithelial paracellular permeability reduction. Ex vivo permeation may be an equivalent method to Caco-2 for drugs that do not produce intestinal membrane phenomena that could affect absorption.

Keywords: Franz cells; Caco-2 cells; intestinal permeability; apparent permeability coefficient

1. Introduction

At the earliest stages of drug product or new pharmaceutical dosage form development, in vitro permeation through Caco-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma cell monolayer line) is widely accepted to estimate the intestinal apparent permeability coefficient (P_{app}). As described in Figure 1, Caco-2 is a donor–receptor compartment apparatus separated by a cell monolayer grown on a porous polycarbonate filter. P_{app} , defined as the flux of a substance permeating a membrane from the donor to receptor compartment normalized by the membrane surface and initial concentration in the donor chamber [1], is usually obtained based on a two-compartmental model approach; however, some authors have developed an alternative definition of a P_{app} index for three-compartment models describing the membrane as well as donor and receiver compartments [2]. This index may be predictive of oral bioavailability, showing an acceptable correlation with a human one, especially for drugs

absorbed by passive diffusion. Carrier-mediated absorption drugs are not so easily extrapolated and require a scaling factor because of the low expression of carriers in this cell line [3]. Both undifferentiated and differentiated Caco-2 models have been developed, with the undifferentiated being more susceptible than the differentiated and, therefore, effective in cytotoxicity and cytoprotective studies [4–8]. More complex differentiated models are suitable for studying transport mechanisms and efficacy of substances [9–12].

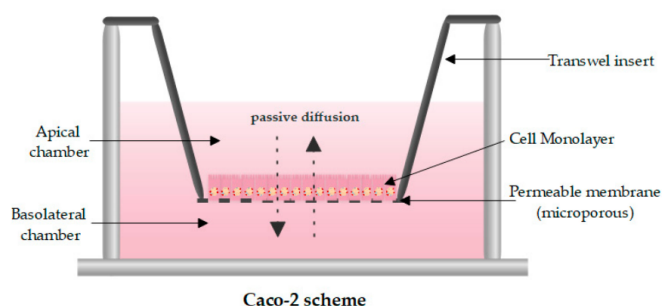


Figure 1. Caco-2 diagram formed by a transwell insert preloaded with polycarbonate membrane inserts with a known pore size. Original figure drawn in Edraw Max 9.4.

Focusing on the relevance of Caco-2 in the design, optimization, and selection of potential candidates in the development of oral drugs, cell monolayer lines have been used for the study of improving the oral absorption of highly lipophilic and poorly water-soluble drugs [13]; lipid-based self-emulsifying drug delivery systems [14]; and for the evaluation of new oral formulations based on nanotechnology, such as solid lipid nanoparticles (SLNps) [15], or bioadhesive drug delivery systems, such as chitosan-modified nanoparticles [10]. Caco-2 has been optimized, although it exhibits variability attributable to biological methods [16], and the significance of emulating physiological conditions to improve in vitro experiments, for example, using bile acids, surfactants, or plasma proteins, is well known for providing a better in vitro–in vivo correlation [17]. Because of their usefulness and relevance, international institutions such as the FDA accept in vitro permeability studies across Caco-2 to classify the permeability of drug substances according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS) proposed in the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines [18].

Regardless of it being an established method, the Caco-2 cell model has some disadvantages, such as its high cost or the need for highly specialized staff, which can be restrictive in both academic and private sector environments, where the optimization of resources is a paramount task. Other limitations are related to the structural and functional differences between a monolayer of cells and a biological membrane, such as the intestinal one. In contrast to Caco-2, which is a monolayer of cells, the gastrointestinal (GI) tract is composed of four main layers: tunica mucosa (mucous layer), tunica submucosa (submucous layer), tunica muscularis (muscle layer), and tunica serosa (serous layer) (Figure 2), which are additionally composed of different layers. Tunica mucosa is the most proximal layer to the lumen, which contains a thick layer of mucous covering the epithelial cells that are linked together by intercellular linkages, and an underlying layer called the lamina propria. The small intestine epithelium is a simple columnar epithelium, typical of regions of high secretion and absorption functions. The cells of simple columnar epithelium form finger-like projections called villi. In addition to intestinal villi, the surface of the cells contains microvilli, which collectively increase the surface area of the lumen by 400–600-fold [19].

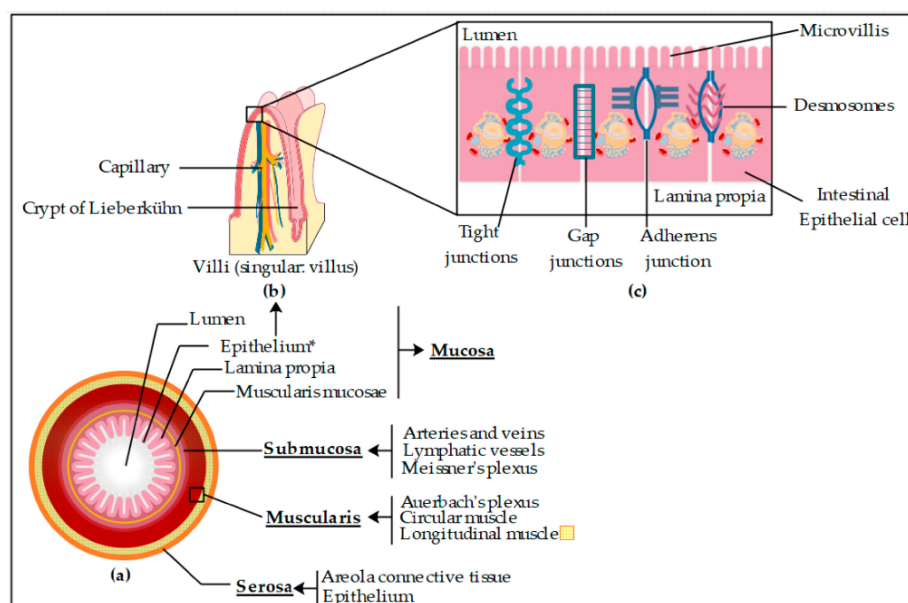


Figure 2. (a) Basic structure of small intestine layers, (b) a simplified schematic representation of villi, and (c) epithelium composed of intestinal epithelial cells including types of intercellular junctions. Original figure drawn from Edraw Max 9.4.

Other important features of GI epithelium are the structural linkages between cells that connect the plasma membrane of neighboring cells. Four classes of intercellular junctions have been described: gap junctions (selective for small molecules such as ions, second messengers, and metabolites), tight junctions (paracellular barrier regulating the movement of water and solutes between epithelial layers), adherens junctions (help to seal the space between cells), and desmosomes (help to maintain shear forces and mechanical stress) (Figure 2c) [19].

GI membrane complexity demonstrates that drug absorption across this barrier is a multipathway process which could be classified as transcellular and paracellular. The most important is the transcellular route, whereby compounds go across the cells by traversing the cell membrane following passive diffusion or carrier-mediated transport (active transport, facilitated diffusion, absorption limited by P-glycoprotein or other efflux transports, intestinal first-pass metabolism followed by absorption of parent and metabolite- and receptor-mediated transport). There is also a paracellular passive diffusion via the junction route [20].

As explained above, the use of Caco-2, although predictive, is a very simplified approach to the GI membrane, so the use of *ex vivo* methods may lead to more accurate predictions of P_{app} . Nejdfor et al. studied the permeability of C-mannitol, fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran 4400, α -lactalbumin, ovalbumin, and FITC-dextran through different intestinal regions of humans, rats, and pigs using small diffusion chambers of 5 mL and 1.74 cm² of exposed tissue area (Navicyte, San Diego, CA, USA) [21]. Differences between intestinal regions and species were detected, and a good correlation between humans and pigs was also observed, mainly for the polyol mannitol in the jejunum and ileum. P_{app} was not compared with Caco-2 values, but the experiment showed that the use of intestinal membranes may be predictive of oral bioavailability.

Considering all the above, the aim of this work was to develop an alternative technique to Caco-2 and small diffusion cells, which allows the evaluation of the intestinal absorption rate or P_{app} for different drugs while using fewer resources and to assess the correlation with Caco-2. The purpose was

to provide a new suitable and economical *ex vivo* method to test and compare new oral formulations or modified release systems, including therapeutic and higher drug concentrations than Caco-2.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical and Reagents

Melatonin (Mel), ketorolac tromethamine (Kt), hydrochlorothiazide (Htz), ammonium dihydrogen phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), phosphoric acid (H_3PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Furosemide (Fur) was supplied by Acofarma (Barcelona, Spain). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), potassium hydroxide (KOH), acetonitrile (ACN), and methanol (MeOH) were purchased from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Hanks' balanced salt solution (HBSS) was purchased from Merck S.L. (Barcelona, Spain). Double-distilled water was obtained from a Milli-Q[®] Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain).

2.2. Instrumentation

HPLC-UV Procedure

The HPLC equipment consisted of a Waters[®] Alliance 2695 Separation Module (Waters Co., Milford, MA, USA) with a 2996 Photodiode Array Detector (DAD) at a wavelength range of 190–800 nm and sensitivity settings from 0.0001 to 2.0000 absorbance units. HPLC parameters are summarized in Table 1 and listed below.

Table 1. Summary of HPLC parameters for ketorolac tromethamine (Kt), melatonin (Mel), furosemide (Fur), and hydrochlorothiazide (Htz).

Molecule	Column	UV- λ (nm)	Mobil Phase	Flow Rate (mL/min)	IV ² (μL)
Kt	C8, 150 \times 2.1 mm, 5 μm	313	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$:THF (70:30)	0.25	100
Mel	C18, 100 \times 4.6 mm, 3.5 μm	223	H_2O :MeOH (55:45)	0.60	100
Fur	C18, 150 \times 3.9 mm, 4 μm	230	KH_2PO_4 :CAN (80:20)	0.50	100
Htz	100 ODS2, 100 \times 4.6, 3 μm	224	NaH_2PO_4 :MeOH:THF ¹	0.70	100

¹ Hydrochlorothiazide HPLC mobile phase consisted of a gradient elution of two solutions: A (93:6:1) and B (47.6:47.6:4.8). ² IV: injection volume.

Kt analysis was conducted with a reverse-phase column C8 (150 \times 2.1 mm) packed up with 5 μm (Kromasil[®], Teknokroma Anlítica, SA; Barcelona, Spain), with a UV detector set up at 313 nm. The mobile phase, previously filtered by a 0.45 μm nylon membrane filter (Technokroma, Barcelona, Spain) and degassed by sonication, consisted of a 70:30 ratio of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (5.75 g/L; pH 3) to THF under isocratic elution at a flow rate of 0.25 mL/min. The injection volume was 10 μL .

Mel analysis was performed with a reverse-phase column C18 (150 \times 4.6 mm) packed up with 3.5 μm (SunFire[®], Waters Co., Milford, MA, USA), with a UV detector set up at 223 nm. The mobile phase, previously filtered by a 0.45 μm nylon membrane filter (Technokroma) and degassed by sonication, consisted of a 55:45 ratio of double-distilled water to MeOH under isocratic elution at a flow rate of 0.6 mL/min. The injection volume was 100 μL .

Fur analysis was carried out with a reverse-phase column C18 (150 \times 3.9 mm) packed up with 4 μm (Nova-Pack[®], Waters Co., Milford, MA, USA), with a UV detector set up at 230 nm. The mobile phase, previously filtered by a 0.45 μm nylon membrane filter (Technokroma, Barcelona, Spain) and degassed by sonication, consisted of an 80:20 ratio of KH_2PO_4 (0.01M; pH of 6.3, adjusted with KOH 10%) to ACN under isocratic elution at a flow rate of 0.5 mL/min. The injection volume was 100 μL .

Htz analysis was conducted with a reverse-phase column ultrabase 100 ODS2 analytical column (100 \times 4.6 mm; diameter of 3 μm (Akady, Spain)) with a UV detector set up at 224 nm. The mobile

phase, previously filtered by a 0.45 μm nylon membrane filter (Technokroma, Barcelona, Spain) and degassed by sonication, consisted of a gradient elution of two solutions (A and B) at a flow rate of 0.7 mL/min. Solution A consisted of 940 mL of NaH_2PO_4 (35.8 g/L; pH of 3.2, adjusted with H_3PO_4) with 60 mL of MeOH and 10 mL of THF. Solution B consisted of 500 mL of NaH_2PO_4 (35.8 g/L; pH of 3.2, adjusted with H_3PO_4) with 500 mL of MeOH and 50 mL of THF. The percentage of B was 20% at time 0, 20% at 4 min, 80% at 10 min, 80% at 12 min, 20% at 13 min, and 20% at 20 min. The injection volume was 100 μL .

2.3. Validation and Verification of Analytical Methods

Previously validated HPLC-UV methods were selected for the analysis of the four assayed analytes. Considering that the samples were obtained from biological sources, the specificity was studied.

Specificity, expressed by the ICH guidelines as the ability to assess an analyte in the presence of components which may be expected to be present, was evaluated by the absence of interference of the phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and other components from biological membranes used as a blank at the retention times shown by the different standard solutions.

2.4. Ex Vivo Permeation Studies through Pig Intestine

2.4.1. Franz Cell System and Intestinal Membrane

Ex vivo permeation was performed in the duodenum, the most proximal portion of the small intestine, of young female pigs (*Sus scrofa*). Animals were sacrificed for other purposes in the Animal Facility at Bellvitge Campus (University of Barcelona, Spain) (no. 7428) (Date of approval: 10 January 2019), and intestinal samples were obtained according to the 3R (reduction, refinement and replacement) principle.

The duodenum was excised, cleaned, and preserved in HBBS at 5 ± 3 $^\circ\text{C}$ for 12 h. Then, 6×6 cm pieces were cut, mounted on the metal ring of the Franz cells as shown in Figure 3, and the remaining corners were trimmed.



Figure 3. Piece of proximal small intestine of young female pigs (*Sus scrofa*) mounted on the metal ring of the Franz cells.

To avoid damage to the biological intestinal membrane, 0.02 M PBS (pH 7.4) was prepared as a receiving medium. The composition was 0.6 g of KH_2PO_4 and 3.17 g of Na_2HPO_4 per liter of double-distilled water. The pH value was adjusted with H_3PO_4 or NaOH.

The ex vivo permeation study was performed in Franz diffusion cells (Vidra Foc Barcelona, Spain), where duodenum portions were placed between the receptor and donor compartments with the basal side in contact with the receiving medium and the apical side in contact with the donor chamber, avoiding bubble formation. The diffusion area was 2.54 cm^2 . A representative chart of the Franz cell system is shown in Figure 4.

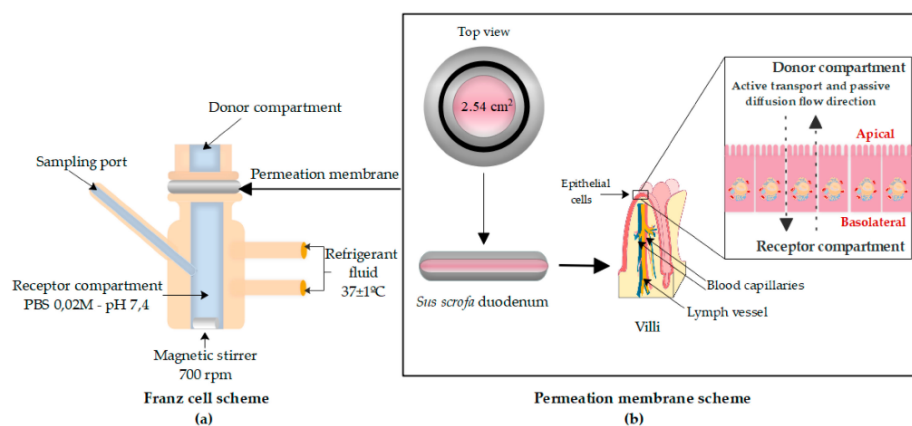


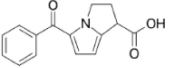
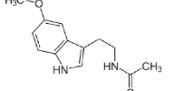
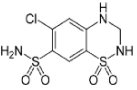
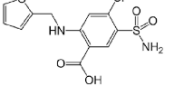
Figure 4. Franz cell scheme (a), including permeation membrane model (b) formed by the proximal small intestine of young female pigs (*S. scrofa*) that were opened with an incision and positioned with the area corresponding to the microvilli of the enterocytes in contact with the donor compartment and the basolateral part in contact with the receptor compartment. Original figure drawn in Edraw Max 9.4.

Homogeneity during experiments was ensured by a small Teflon[®]-coated magnetic stir bar at 700 rpm. The diffusion cells were previously incubated in a water bath to equalize the temperature in all cells (37 ± 1 °C).

2.4.2. Donor Solution Preparation and Sampling Method

Four drugs according to BCS classification were randomly selected. Table 2 includes the chemical structure; pKa (negative base 10 logarithm of the acid dissociation constant (K_a) of a solution) values; and tested formulations, including solvents, drug concentration, and pH.

Table 2. Name, structure, Biopharmaceutics Classification System (BCS) type, and pKa (negative base 10 logarithm of the acid dissociation constant (K_a) of a solution) of selected drugs for permeation experiments.

Molecule	Structure	BCS	pKa	Dissolution Media	Concentration
Ketorolac tromethamine		Class 1	3.5 [22]	PBS pH 7.4	1 mg/mL
Melatonin		Class 2	16.5 [23]	PBS pH 7.4	0.8 mg/mL
Hydrochlorothiazide		Class 3	7.9 [24]	PBS pH 7.4	0.05 mg/mL
Furosemide		Class 4	3.9 [25]	PBS pH 7.4	0.6 mg/mL

All the drugs were dissolved by stirring at 30 ± 0.1 °C in PBS (pH 7.4) to guarantee the biocompatibility to the permeation membrane. Infinite dose conditions were ensured in all experiments.

The donor compartment was then sealed by parafilm to prevent water evaporation. All the experiments were carried out under sink conditions, ensuring that the drug concentration in the receptor compartment was negligible compared to the donor one.

Samples of 300 μL were collected via a sampling port from the middle of the receptor compartment at preselected time intervals (30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, and 420 min) for 7 h. The removed sample volume was immediately replaced with the same volume of tempered fresh receiving medium of each molecule with great care to avoid trapping air beneath the membrane.

2.4.3. Sample Analysis

The cumulative amount of the different BCS drugs through the small intestine membrane from the acceptor compartment was monitored by a validated HPLC-UV methodology. Results are reported as mean \pm SD of five experiments for each drug.

2.4.4. Data Treatment and Statistical Analysis

Our permeability model has the same structure as the two-compartment classic model, composed of donor (apical) and receptor (basal) chambers, both separated by the permeation membrane. So, apical-to-basal P_{app} was calculated based on classic parameters according to Equation (1):

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

where (dQ/dt) is the transport rate or flux (J) ($\mu\text{g}/\text{min}$) across the biological membrane, C_0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) is the initial concentration of the drug in the donor chamber, and A is the surface area (cm^2) of the permeation membrane.

The cumulative amount (Q) (μg) permeated through porcine duodenum was obtained by multiplying the acquired concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of each drug at the receptor chamber and the volume (mL) of the receptor chamber. J ($\mu\text{g}/\text{min}$) was calculated as the slope at the steady state obtained by linear regression analysis (GraphPad Prism[®] software, v. 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) of Q as a function of time (min). Then, P_{app} (cm/min) was calculated according to Equation (1) by dividing the J ($\mu\text{g}/\text{min}$), the permeation area (A) (2.54 cm^2), and the initial drug concentration (C_0) ($\mu\text{g}/\text{mL} = \mu\text{g}/\text{cm}^3$) in the donor chamber. Finally, the units were expressed in centimeters per second for comparison with the obtained results in the Caco-2 experiments. It was assumed that under sink conditions, the drug concentration in the receptor compartment is negligible compared to the donor compartment.

Obtained experimental data were analyzed by unpaired Student's t -test to compare P_{app} values for both bibliographic Caco-2 results and experimental data obtained with Franz cells. A p -value < 0.05 was established as an indicator of statistically significant differences.

3. Results and Discussion

3.1. Obtained Kinetics Parameters and P_{app} Calculation

Table 3 shows the kinetics parameters of Kt, Mel, Fur, and Htz. Cumulative permeated drug was measured. Then, the flux and flux normalized by the permeation area (2.54 cm^2) were calculated.

Table 3. Permeation parameters for Kt, Mel, Fur, and Htz solutions in vertical Franz cells ($n = 5$).

Permeation Parameters	Kt	Mel	Htz	Fur
Flux ($\mu\text{g}/\text{min}$)	0.855 ± 0.069	0.683 ± 0.016	0.004 ± 0.0002	0.0180 ± 0.0018
Flux/sup ($\mu\text{g}/(\text{cm}/\text{min})$)	0.336 ± 0.027	0.268 ± 0.006	0.0015 ± 0.0001	0.0071 ± 0.0001
Co ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1000	800	50	600
P_{app} ($\times 10^{-6}$) (cm/s)	5.609 ± 0.452	5.598 ± 0.130	0.487 ± 0.026	0.196 ± 0.020

Abbreviation: P_{app} —apparent permeability coefficient.

Figure 5 shows Kt, Mel, Htz, and Fur cumulative permeated amounts in micrograms as a function of time (min).

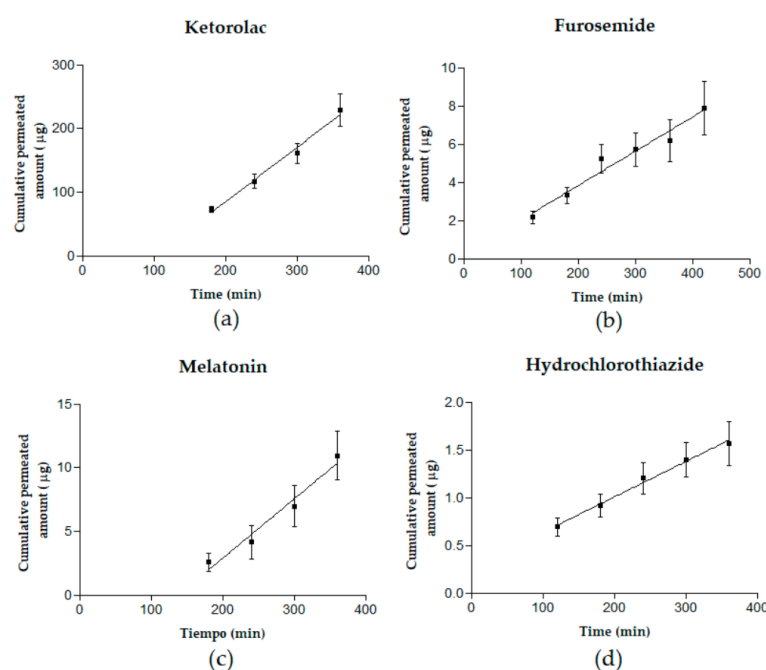


Figure 5. Cumulative permeated amounts (μg) as a function of time (min) of ketorolac tromethamine (a), melatonin (b), furosemide (c), and hydrochlorothiazide (d). Results are reported as mean \pm SD ($n = 5$).

3.2. Specificity

Under the assay conditions described in the methodology section for each analyte, the mean retention times of Kt, Fur, Mel, and Htz were 9.45, 3.03, 5.05, and 9.5 min, respectively. The selectivity of the selected analytical method was confirmed by the studied chromatograms (Table S1), where Kt, Fur, Mel, and Htz peaks did not overlap with any other of the endogenous components of the medium. Blanks were obtained at time T_0 , from the receptor compartment, after incubation of diffusion cells and before adding the drugs. Therefore, the method is considered specific for the detection and quantification of the four molecules.

3.3. Correlation between P_{app} in Caco-2 versus Franz Cells

After a literature search, different Caco-2 permeation studies and P_{app} values were found for the tested drugs, which are summarized in Table 4.

Table 4. P_{app} values expressed as mean \pm SD (cm/s) from different literature datasets about Kt, Mel, Fur, and Htz in Caco-2 experiments.

Drug	P_{app} ($\times 10^{-6}$) (cm/s) (AP \rightarrow BL) Caco-2 Cells
Kt	8.30 ± 5.20 ($n = 6$) (HBBS ¹ pH 7.4) [26]
Mel	12.50 ± 0.01 ($n = 3$) (HEPES ² pH 7.4) [27]
Htz	0.51 ± 0.02 ($n = 3$) (HBBS ¹ pH 7.4) [28]
Fur	0.19 ± 0.01 ($n = 3$) (KBR ³ pH 7.4) [29]

¹ Hank's balanced salts solution; ² 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; ³ Krebs-Ringer modified buffer (KBR).

Table 5 shows that no statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed correlating Franz diffusion cells and Caco-2 cell experiments P_{app} values for Kt, Htz, and Fur. However, there were statistically significant differences ($p < 0.05$) correlating P_{app} values for Mel. Figure 6 shows a plot of statistical correlation.

Table 5. Statistical correlation between both Franz diffusion cells and Caco-2 experiments. P_{app} values are expressed as mean \pm SD (cm/s) for Kt, Mel, Fur, and Htz.

Drug	P_{app} ($\times 10^{-6}$) (cm/s) (AP \rightarrow BL)		Unpaired t -Test (p)
	Franz Diffusion Cells (PBS pH 7.4)	Caco-2 (pH 7.4) ¹	
Kt	5.61 ± 0.45 ($n = 5$)	8.3 ± 5.2 ($n = 6$) [26]	0.28 ($p > 0.05$)
Mel	5.60 ± 0.13 ($n = 5$)	12.50 ± 0.01 ($n = 3$) [27]	0.0001 ($p < 0.05$) *
Htz	0.49 ± 0.03 ($n = 5$)	0.42 ± 0.33 ($n = 3$) [28]	0.30 ($p > 0.05$)
Fur	0.20 ± 0.020 ($n = 5$)	0.19 ± 0.01 ($n = 3$) [29]	0.87 ($p > 0.05$)

¹ Caco-2 experiments were carried out in Hank's balanced salts solution (pH 7.4) for Kt and Htz, HEPES (pH 7.4) for Mel, and KBR pH 7.4 for Fur.

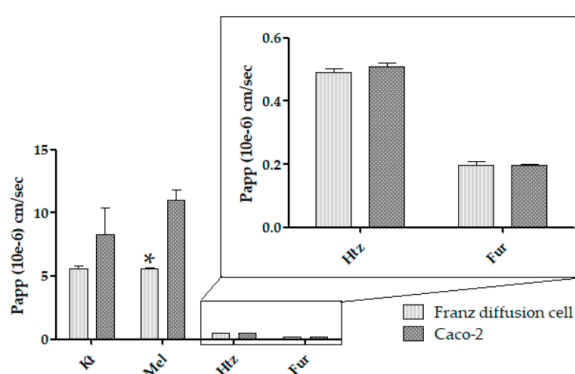


Figure 6. Comparative P_{app} between both Franz diffusion cells and Caco-2 cell culture for Kt, Mel, Htz, and Fur. Data are expressed as mean \pm SD $\times 10^{-6}$ (cm/s). * $p < 0.05$.

P_{app} statistical correlation for both Franz diffusion cells and Caco-2 cell culture indicates that the ex vivo permeation is an equivalent method to Caco-2 for Kt, Htz, and Fur, which are BCS classes 1, 3,

and 4, respectively. Regarding Mel, the obtained Franz diffusion cell P_{app} values showed statistically significant differences, with the ex vivo permeation data being 1.79 times lower than Caco-2. This could be related to the intestinal accumulation of Mel described in mammals [30], where Mel intestinal receptors MT1 and MT2 are involved in multiple roles, such as regulation of gastrointestinal motility and epithelial permeability [31]. It could also be explained by the fact that Mel, although it exhibits protein-facilitated transport [32], reduces the duodenal epithelial paracellular permeability [33]. This may justify the P_{app} value of $2.31 \pm 0.12 \times 10^{-6}$ cm/s ($n = 4$) for Mel obtained by other authors in an ex vivo permeation through rat jejunum in small diffusion chambers [34], which is also a lower and statistically different value than Caco-2. The difference may be also associated with the cytotoxicity in Caco-2 promoted by Mel concentrations of 1.56 and 0.78 $\mu\text{g/mL}$ [35]. The ultrastructural damage in a simple structure such as a monolayer of cells would increase permeability through tight junctions, leading to an increased P_{app} value. Both circumstances would explain the differences. Drug solubility is not a limiting factor when applying Franz diffusion cells through an intestinal ex vivo membrane since Fur, which is BCS class 4, shows a good correlation. In contrast, intestinal membrane phenomena that modify intestinal permeation, such as accumulation or metabolism (among others), may hinder this method in the case of Mel.

4. Conclusions

A new ex vivo technique based on permeation through pig small intestinal membrane was developed. It allows the prediction of absorption rate or P_{app} and apical-to-basal permeation for different BCS drugs. This ex vivo method requires fewer economic resources than other in vitro techniques for P_{app} determination, providing a new suitable process to test and compare new oral formulations or modified release systems, including therapeutic and higher drug concentrations than Caco-2. Application of this method requires determining if the drug produces intestinal membrane phenomena that could affect the absorption process.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4923/11/12/638/s1>, Table S1: HPLC-UV chromatograms of blank vs. standard solutions of ketorolac, furosemide, melatonin and Htz.

Author Contributions: Conceptualization, B.C., A.C.C., and A.B.S.; methodology, B.C., A.C.C., and A.B.S.; software, A.C.C. and A.B.S.; formal analysis, A.B.S.; investigation, A.B.S.; data curation, A.B.S. and A.C.C.; writing—original draft preparation, A.B.S.; writing—review and editing, B.C. and A.B.S.; supervision, B.C., M.M., and A.C.C.; project administration, B.C. and A.C.C.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We would like to thank Álvaro Gimeno Sandig, Director of Animal House Bellvitge of University of Barcelona and Lidia Gómez Segura from the Ethical Committee of Animal Experimentation at the University of Barcelona for their contribution in the intestinal samples obtaining process.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sugano, K. *Biopharmaceutics Modeling and Simulations: Theory, Practice, Methods, and Applications*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012; pp. 66–102.
2. Palumbo, P.; Picchini, U.; Beck, B.; Gelder, J.; Van Delbar, N. A general approach to the apparent permeability index. *J. Pharm. Pharm.* **2008**, *35*, 235–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lennernäs, H.; Palm, K.; Fagerholm, U.; Artursson, P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int. J. Pharm.* **1996**, *127*, 103–107. [[CrossRef](#)]
4. Jiang, K.; Huang, C.; Jiao, R.; Bai, W.; Zheng, J.; Ou, S. Adducts formed during protein digestion decreased the toxicity of five carbonyl compounds against Caco-2 cells. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *363*, 26–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Jiang, L.; Li, Z.; Xie, Y.; Liu, L.; Cao, Y. Cyanidin chloride modestly protects Caco-2 cells from ZnO nanoparticle exposure probably through the induction of autophagy. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *127*, 251–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Juan-García, A.; Montesano, D.; Mañes, J.; Juan, C. Cytoprotective effects of carotenoids-rich extract from *Lycium barbarum* L. on the beauvericin-induced cytotoxicity on Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *133*, 110798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Gómez, L.J.; Gómez, N.A.; Zapata, J.E.; López-García, G.; Cilla, A. In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera hydrolysates. *Food Res. Int.* **2019**, *120*, 52–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Li, Q.; Liang, X.; Guo, N.; Hu, L.; E, M.P.; Wu, Y.; Wang, K. Protective effects of Bee pollen extract on the Caco-2 intestinal barrier dysfunctions induced by dextran sulfate sodium. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109200. [[CrossRef](#)]
9. Ciappellano, S.G.; Tedesco, E.; Marco Venturini, M.; Benetti, F. In vitro toxicity assessment of oral nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 381–401. [[CrossRef](#)]
10. Dou, T.; Wang, J.; Han, C.; Shao, X.; Zhang, J.; Lu, W. Cellular uptake and transport characteristics of chitosan modified nanoparticles in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 791–799. [[CrossRef](#)]
11. Yan, X.; Cao, S.; Li, Y.; Xiao, P.; Huang, Z.; Li, H.; Ma, Y. Internalization and subcellular transport mechanisms of different curcumin loaded nanocarriers across Caco-2 cell model. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *52*, 660–669. [[CrossRef](#)]
12. Lu, C.; Fu, K.; Cao, K.; Wei, J.; Zhou, J.; Zhao, D.; Zhang, Y. Permeability and transport mechanism of trihexyphenidyl hydrochloride in Caco-2 cell monolayer model with a validated UPLC-MS/MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, 112924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Xue-Qing, C.; Stefanski, K.; Shen, H.; Huang, C.; Caporuscio, C.; Yang, W.; Lam, P.; Su, C.; Gudmundsson, O.; Hageman, M. Oral delivery of highly lipophilic poorly water-soluble drugs: spray-dried dispersions to improve oral absorption and enable high-dose toxicology studies of a P2Y1 antagonist. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *12*, 3924–3931.
14. Bu, P.; Ji, Y.; Narayanan, S.; Dalrymple, D.; Cheng, X.; Serajuddin, A.T. Assessment of cell viability and permeation enhancement in presence of lipid-based self-emulsifying drug delivery systems using Caco-2 cell model: Polysorbate 80 as the surfactant. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *99*, 350–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chai, G.; Xu, Y.; Chen, S.; Cheng, B.; Hu, F.; You, J.; Du, Y.Z.; Yuan, H. Transport mechanisms of solid lipid nanoparticles across Caco-2 cell monolayers and their related cytotoxicology. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 5929–5940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Markowska, M.; Oberle, R.; Juzwin, S.; Hsu, C.P.; Gryszkiewicz, M.; Streeter, A.J. Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. *J. Pharm. Toxicol. Methods* **2001**, *46*, 51–55. [[CrossRef](#)]
17. Yamashita, S.; Furubayashi, T.; Kataoka, M.; Sakane, T.; Sezaki, H.; Tokuda, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 195–204. [[CrossRef](#)]
18. Committee for Human Medicinal Products. *ICH Guideline M9 on Biopharmaceutics Classification System Based Biowaivers*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
19. Wellcome, M.O. *Gastrointestinal Physiology*, 1st ed.; Springer: Basel, Switzerland, 2018; pp. 53–219.
20. Balimane, P.V.; Chong, S. Evaluation of permeability and P-glycoprotein interactions: Industry outlook. In *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, 1st ed.; Krishna, R., Yu, L., Eds.; Springer Science + Business Media, LLC: New York, NY, USA, 2008; pp. 101–105.
21. Nejdfor, P.; Ekelund, M.; Jeppsson, B. Mucosal in vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: Species- and region-related differences. *Scand. J. Gastroenterol.* **2009**, *35*, 501–507.
22. United States Pharmacopeial Convention. *USP DI*, 21th ed.; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2006; Volume 1, Parts 1–2; Volumes 2–3; pp. 39–40.
23. Römsing, S. Development and Validation of Bioanalytical Methods, Application to Melatonin and Selected Anti-Infective Drugs. Ph.D. Thesis, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 16 November 2010.
24. O’Neil, M.J.; Smith, A.; Henckelman, P.E.; Budavari, S. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13th ed.; Merck & Co., Inc.: Kenilworth, NJ, USA, 2001; p. 854.
25. Khan, S.J.; Orgerth, J.E. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* **2004**, *54*, 355–367. [[CrossRef](#)]

26. Jung, S.J.; Choi, S.O.; Um, S.Y.; Kim, J.I.; Choo, H.Y.; Choi, S.Y.; Chung, S.Y. Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure-permeability relationship. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *41*, 469–475. [[CrossRef](#)]
27. Yeleswaram, K.; Lg, M.; Jo, K.; Schabdach, D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J. Pineal Res.* **1997**, *22*, 45–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yazdaniyan, M.; Glynn, S.L.; Wright, J.L.; Hawi, A. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bock, U.; Flototto, T.; Haltner, E. Validation of cell culture models for the intestine and the blood-brain barrier and comparison of drug permeation. *ALTEX* **2004**, *21* (Suppl. 3), 57–64.
30. Lee, P.P.N.; Shiu, S.Y.W.; Chow, P.H.; Pang, S.F. regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duck gastro-intestinal tract. *Neurosignals* **1995**, *4*, 212–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Söderquist, F.; Hellström, P.M.; Cunningham, J.L. Human gastroenteropancreatic expression of melatonin and its receptors MT1 and MT2. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Mayo, J.C.; Aguado, A.; Cernuda-Cernuda, R.; Álvarez, A.; Cepas, V.; González, I.Q.; Rosa, M.S. Melatonin uptake by cells: An answer to its relationship with glucose? *Molecules* **2018**, *23*, 1999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Res, P. Melatonin decreases duodenal epithelial paracellular permeability via a nicotinic receptor – dependent pathway in rats *in vivo*. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 282–291.
34. Tran, H.T.; Tran, P.H.; Lee, B. New findings on melatonin absorption and alterations by pharmaceutical excipients using the Ussing chamber technique with mounted rat gastrointestinal segments. *Int. J. Pharm.* **2009**, *378*, 9–16. [[CrossRef](#)]
35. Batista, A.P.; Da Silva, T.G.; Teixeira, A.A.; De Medeiros, P.L.; Teixeira, V.W.; Alves, L.C.; Dos Santos, F.A.; Silva, E.C. Ultrastructural aspects of melatonin cytotoxicity on Caco-2 cells *in vitro*. *Micron* **2014**, *59*, 17–23. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6. Artículo 3

Study of Melatonin as Preventive Agent of Gastrointestinal Damage Induced by Sodium Diclofenac

*(Estudio de la melatonina como agente preventivo del daño
gastrointestinal inducido por el diclofenaco sódico)*

Autores: Aroha B. Sánchez, Beatriz Clares, María J. Rodríguez-Lagunas, María J.
Fábrega, Ana C. Calpena.

Cells 2020, 9, 180

Índice de impacto: 5.856 (ISI Journal Citations Reports)





Categoría: **Bioquímica (Q1)**
 Genética (Q1)
 Biología Molecular (Q1)

Resumen

El perfil de seguridad de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se ha estudiado ampliamente y tanto los efectos terapéuticos como los secundarios a nivel gástrico y cardiovascular se han asociado generalmente con el efecto inhibitor de las isoformas de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y 2 (COX-2). En la actualidad existen evidencias de la participación de múltiples vías celulares en el daño gastrointestinal (GI) mediado por AINE, que se relaciona entre otros con el estado redox de los enterocitos. En un artículo de revisión previo, resumimos el papel clave de la MLT como antioxidante en la inhibición de las vías de inflamación mediadas por el estrés oxidativo en varias enfermedades. Esto nos hace preguntarnos si la MLT podría minimizar o prevenir los efectos secundarios GI producidos por los AINE. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la MLT como agente preventivo de las lesiones GI causadas por los AINE. Para ello, se administró diclofenaco sódico (SD) solo y con MLT en dos modelos experimentales: Estudios *ex vivo* en intestino de cerdo, utilizando células Franz y estudios *in vivo* en ratones en los que se examinó el estómago y el intestino de todos los animales. La evaluación histológica de las muestras de intestino de cerdo mostró que el SD indujo la alteración de las microvellosidades y que dicha alteración fue prevenida por la MLT. Los experimentos *in vivo* mostraron que el SD alteró la mucosa del estómago de los ratones e indujo daño tisular que fue prevenido en los animales que recibieron tratamiento concomitante de MLT. La evaluación por transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) de dos marcadores bioquímicos: COX-2 e iNOS, mostró un aumento de ambas moléculas en los tejidos menos lesionados, lo que sugiere que la MLT promueve la curación del tejido al mejorar el estado redox y al aumentar los niveles iNOS/NO que en condiciones no oxidativas son responsables del mantenimiento de la integridad del epitelio GI, del aumento del flujo sanguíneo y la angiogénesis. Además, en presencia de la MLT, la COX-2 puede ser responsable de la cicatrización de las heridas en los enterocitos. Por lo tanto, nuestro estudio demuestra que la MLT sería un agente preventivo de los daños GI inducidos por AINE cuando se administran conjuntamente.

Article

Study of Melatonin as Preventive Agent of Gastrointestinal Damage Induced by Sodium Diclofenac

Aroha B. Sánchez ¹, Beatriz Clares ^{2,*} , María J. Rodríguez-Lagunas ³ , María J. Fábrega ³ 
and Ana C. Calpena ¹ 

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; aroha_89_1@hotmail.com (A.B.S.); anacalpena@ub.edu (A.C.C.)

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

³ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); mjfabrega.f@gmail.com (M.J.F.)

* Correspondence: beatrizclares@ugr.es; Tel.: +34-958-246-664

Received: 30 November 2019; Accepted: 8 January 2020; Published: 10 January 2020



Abstract: Safety profile of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has been widely studied and both therapeutic and side effects at the gastric and cardiovascular level have been generally associated with the inhibitory effect of isoform 1 (COX-1) and 2 (COX-2) cyclooxygenase enzymes. Now there are evidences of the involvement of multiple cellular pathways in the NSAIDs-mediated-gastrointestinal (GI) damage related to enterocyte redox state. In a previous review we summarized the key role of melatonin (MLT), as an antioxidant, in the inhibition of inflammation pathways mediated by oxidative stress in several diseases, which makes us wonder if MLT could minimize GI NSAIDs side effects. So, the aim of this work is to study the effect of MLT as preventive agent of GI injury caused by NSAIDs. With this objective sodium diclofenac (SD) was administered alone and together with MLT in two experimental models, ex vivo studies in pig intestine, using Franz cells, and in vivo studies in mice where stomach and intestine were studied. The histological evaluation of pig intestine samples showed that SD induced the villi alteration, which was prevented by MLT. In vivo experiments showed that SD altered the mice stomach mucosa and induced tissue damage that was prevented by MLT. The evaluation by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) of two biochemical markers, COX-2 and iNOS, showed an increase of both molecules in less injured tissues, suggesting that MLT promotes tissue healing by improving redox state and by increasing iNOS/NO that under non-oxidative condition is responsible for the maintenance of GI-epithelium integrity, increasing blood flow and promoting angiogenesis and that in presence of MLT, COX-2 may be responsible for wound healing in enterocyte. Therefore, we found that MLT may be a preventive agent of GI damages induced by NSAIDs.

Keywords: melatonin; NSAIDs; gastric injuries; antioxidant

1. Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) world sales of last year confirm that they still are one of the most consumed drugs (Figure 1). The safety profile of NSAIDs has been widely studied. Therapeutic and side effects at the gastric and cardiovascular level have been popularly associated with the inhibitory effect on endoperoxide-I synthase1 and -2 (PGI-1Ss) also known as cyclooxygenase enzymes (COX).

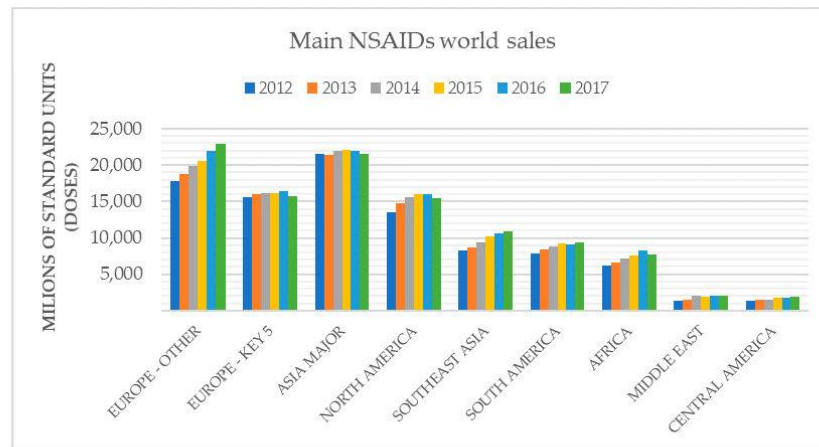


Figure 1. IQVIA® (IQVIA Inc., Parsippany, NJ, United States) data about the main nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) world sales from 2012 to 2017, including Europe (Key 5 are Germany, France, Italy, Spain, and Britain), Asia, North, South, and Central America, Africa, Middle East, and Southeast Asia.

Two isoforms of COX have been characterized, the constitutive COX (COX-1), which is expressed in most mammalian tissues, and the inducible COX (COX-2) [1]. Both catalyze the oxidation of arachidonic acid (AA) to prostaglandin G₂ (PGG₂), which leads to prostaglandin H₂ (PGH₂) by the action of peroxidase, then the tissue-specific prostaglandin synthases lead to all the different prostaglandins, prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin E₂α (PGE₂α), prostaglandin E₂ (PGE₂), prostacyclin (PGI₂), and thromboxane A₂ (TXA₂) [2] (Figure 2).

Classical outcomes associated COX-2 expression, with proinflammatory and pain events [3,4], Xie et al. were the first to demonstrate that COX-2 gene expression is induced in inflammation conditions in 1991 [5], while COX-1 was described as protector of gastric mucosa since several authors had described that prostaglandins PGE₂ had cytoprotective [6], antiulcer effects [7,8], and PGE₂ synthesis was found to be more related to COX-1 than to COX-2 [9]. PGI₂ was also described as a potent inhibitor of in vivo gastric acid secretion and enhancer of mucosal blood flow when infused intravenously [10].

It was widely accepted that the main cause of non-selective NSAIDs gastrointestinal (GI) damage, was the inhibition of COX-1 pathways, which triggered the research for selective inhibitors of COX-2 (COXIBS) [11]. Selective inhibitors of COX-2 seemed to have a safer GI profile than classical NSAIDs but over the time it was shown an increased risk of cardiovascular side effects, decreasing the benefit-risk balance of these drugs [12,13]. Among other reasons, the key-role of COX-2 in the synthesis of PGI₂ is explained by the fact that it is an important vascular-protector with vasodilator, antithrombotic, antiaggregant, and anti-inflammatory properties [14]. In the mid-90s Langenbach et al. reported that inhibition of COX-1 does not cause spontaneous gastric damage [15,16], and some years later, new findings associated COX-2 gene expression to wound healing in enterocytes via p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK) [17] evidencing that the concept of assigning homeostatic and pathological functions to COX-1 and COX-2 respectively was a plain approach.

Currently, there are evidences of the involvement of multiple cellular pathways in NSAIDs-mediated-GI damage. The specific sequence is unknown but could be initiated by the alteration of the protective gastric mucus layer [18] as result of the interaction of NSAIDs with phospholipids (PL) as phosphatidylcholine (PC) [19,20] the main component of gastric mucus layer and mucosa [21]. Studies proved that NSAIDs have a strong affinity to form ionic and hydrophobic, non-covalent and reversible associations with zwitterionic PL (specifically PC) [20]. The direct

interaction between NSAIDs and PL together with the decreased mucus secretion by inhibition of PGE_2 , also mediated by the anti-inflammatory drugs [22], may lead changes in the fluidity, permeability, and biomechanical properties of cellular membrane of the gastric epithelium. The invasion of the intestinal mucosa by the enterobacteria would be responsible for the immune response, including adherence and infiltrate of leucocyte (neutrophils), when lipopolysaccharide (LPS) and other endotoxins are recognized by Toll-like receptor 4 (TLR-4), which via myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) protein [23] results in the activation of nuclear factor $\text{K}\beta$ ($\text{NF}\kappa\beta$) target genes that are then responsible for inducible form of nitric oxide synthetase (iNOS) and COX-2 expression [24,25]. Neutrophils trigger the emergence of superoxide radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$) that react with nitric oxide (NO) leading in peroxynitrites (ONOO^-), high reactive molecules responsible for protein oxidation, lipid peroxidation and enzymes inactivation [26], main origin of apoptosis and necrosis of gastric epithelium.

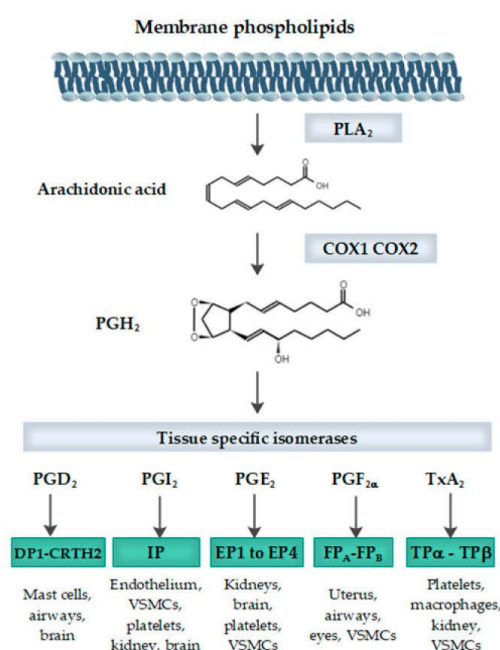


Figure 2. Synthesis of prostaglandins scheme from membrane phospholipids, including enzymes, substrates, and receptors. PLA₂ (phospholipase A₂); COX1 (cyclooxygenase 1); COX2 (cyclooxygenase 2); PGH₂ (prostaglandin H₂); PGD₂ (prostaglandin D₂); DP1 and CRTH2 (DP2) (D-prostanoids receptors); PGI₂ (prostacyclin); IP (prostacyclin receptor); PGE₂ (prostaglandin E₂); EP1 to EP4 (prostaglandin receptors); PGF_{2α} (prostaglandin F_{2α}); FP_A and FP_B (prostanoid receptors, isoform A and B); TxA₂ (thromboxane A₂); and TP_α and TP_β (thromboxane prostanoid receptors). Figure edited with EdrawTMMax 9.4 (Edrawsoft, Hong Kong, China, 2019).

A parallel mechanism, also responsible for production of reactive oxygen species (ROS) and leucocyte infiltration that feeds the cycle of ONOO^- exacerbating the injuries, is a consequence of the inhibition of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) by NSAIDs, this increases the entry of pyruvate into the mitochondria, which finally, owing also to the inhibition of acyl-CoA carboxylase (ACC) by NSAIDs, leads to the uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation [27]. The uncoupling of oxidative phosphorylation, which finally results in depleted adenosine triphosphate (ATP) levels [28,29], depends on the pKa (the negative base -10 logarithm of the acid dissociation constant (K_a)) of the NSAID, the lower the pKa value, the minimum concentration is required

to uncouple oxidative phosphorylation [30], it also explains why the stronger the acid the higher the injuries.

The role of iNOs/NO depends on the epithelium redox state, under non-oxidative condition NO is an endogenous molecule responsible for the maintenance of GI-epithelium integrity, increasing blood flow and promoting angiogenesis via vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways [31–33], but in the presence of O_2^- , as explained before NO contributes to ONOO⁻ production. NO has been proved as protective molecule against NSAIDs-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion [34] but it is known that it also plays a role as an inhibitor in the regulation of gastric acid secretion [35].

Different studies showed a direct relation between acid and GI injuries induced by NSAIDs, in fact the main prescribed drugs to prevent such injuries are the proton-pump inhibitors (PPI) [36,37], Fornai suggests that beneficial effects of PPIs on mucosal injury are likely to be independent from the COX-2/PGE₂/VEGF pathway [38] so considering all the involved cellular pathways it can be deduced that the intact mucus layer protects epithelium from the action of acid pepsin, protons, [H⁺] and, in addition, when the barrier is damaged, acid aggravates gastric injuries. There are also evidences of an increased basal gastric acid concentration mediated by NSAIDs due to the basal gastric fluid volume reduction [39].

Regardless of selective COX-2 inhibitors (COXIBS) manifested less GI damage [40], it is known that COX-2 has an essential role in enterocyte wound healing, through a mechanism related with NFKB β via and p38MAPK-dependent histone 3 phosphorylation, which is an important component of the intestinal wound-healing response [17], additionally PGE₂ participates in the differentiation of human goblet intestinal epithelial cells during homeostatic conditions [41] and PGI₂ in angiogenesis [10]. Bile salts seems also be related with intestinal damage cause by NSAIDs by forming super-toxic micelles [42,43], injuries that could be avoided by PC [44] evidencing the role of mucus barrier as protective factor of GI mucosa from lesions generated by NSAIDs.

Although, GI safety profile depends on the dose and kind of NSAID and a benefit-risk assessment strategy to select an anti-inflammatory drug has been described [45], GI events related to chronic NSAID consumption must be considered.

The use of PPI is highly accepted, different studies concluded that the efficacy and safety levels are acceptable [46] but a new trend, focused on the relationship between intestinal microbiota and several diseases, shows up that a pH change in the GI tract, would be related to a change in the microbiota [47], hence chronic use of proton-pump inhibitors could be related to small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) [48], *Candida albicans* infections [49], and vitamin B12 deficiency in some population groups such as the elderly [50].

The above together with the new findings about involved pathways pH-independent in GI injury caused by NSAIDs, lead us to think about different strategies than PPI to prevent GI damage cause by NSAIDs.

In a previous review [51] we summarized how melatonin (MLT), as an antioxidant molecule, inhibits inflammation processes associated to different illnesses. The link between enterocyte redox state and NSAIDs GI pathology encouraged us to study if MLT administration would affect in some way. To evaluate the role of MLT in GI injury prevention induced by NSAIDs, SD was selected as GI damage model because this NSAID has a pKa of 4.15 [52] and as explained before, there is a highly significant inverse correlation between pKa and concentration required for maximum stimulation of mitochondrial oxidative stress. The higher the pKa value, the lower concentration required for maximum uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation [31]. When comparing with other NSAIDs, such as acetylsalicylic acid (ASA) whose pKa is 3.5, an almost four times higher concentration of ASA is necessary to produce the same effect as SD. Furthermore, other authors studied the role of MLT to recover intestinal permeability after a SD treatment [53], so SD is a proper model of GI injury.

The main objective of this work is to study and to evaluate the effect of MLT as preventive agent of GI injury caused by SD in two different models, ex vivo and in vivo.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical and Reagents

MLT, SD, phosphoric acid (H_3PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), formaldehyde, and paraffin wax were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), potassium hydroxide (KOH), methanol (MeOH), and phosphoric acid (H_3PO_4) were purchased from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Hanks' Balanced Salt solution (HBSS), hematoxylin and eosin were purchased from Merck S.L. (Barcelona, Spain). Double-distilled water was obtained from a Milli-Q[®] Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain). TRIzol reagent and RevertAid First Strand cDNA synthesis kit were purchased from Thermo Fisher Scientific (Barcelona, Spain).

2.2. Ex Vivo NSAID/ML Administration in Pig Intestine

As the previous stage of in vivo studies, we set and validated an ex vivo model [54], which allows the study of the local effect of SD and MLT in the small intestinal mucosa; at the same time, the model allows the evaluation of the intestinal apparent permeability coefficient (Papp) for SD. Papp of SD alone and in combination with MLT were compared to evaluate the influence of MLT in the intestinal absorption of SD.

Ex vivo experiments were performed as described a previous paper [54] in the duodenum, the most proximal portion of the small intestine, of young female pigs (*Sus scrofa*). Animals were sacrificed for other purposes in the Animal Facility at Bellvitge Campus (University of Barcelona, Barcelona, Spain) and intestinal samples were obtained according to the 3R (reduction, refinement and replacement) principle.

Duodenum was excised, after that cleaned and preserved in HBBS at 5 ± 3 °C for 12 h. Then 6 cm \times 6 cm pieces were cut, mounted on Franz cells (Vidrafoc, Barcelona, Spain). To avoid damages in the biological intestinal membrane, 0.02 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 was prepared as receiving media. Composition was 0.6 g of KH_2PO_4 and 3.17 g of Na_2HPO_4 per liter of double-distilled water. pH was adjusted to 7.4 with H_3PO_4 or NaOH. Homogeneity and simulation of intestinal conditions during experiments were ensured by a small Teflon[®] coated magnetic stir bar at 700 revolutions per minute of rotor (rpm) corresponding to a relative centrifugal force (rcf) or G-force of 2. The diffusion cells were previously incubated in a water bath to equalize the temperature in all cells (37 ± 1 °C).

Of SD 1 mg/mL in PBS pH 7.4, alone or in combination with 0.5 mg/mL of MLT in PBS pH 7.4, were applied into the donor chamber and sealed by parafilm immediately to prevent water evaporation. After six hours of simulated permeation duodenum samples were prepared, according Sections 2.4 and 2.5, to perform histological analysis and COX-2/iNOS determination. Different experimental group are summarized in Table 1.

Table 1. Ex vivo experimental groups.

Group Number	Permeated Drug	Permeated Solution	Dose
1 (n = 6)	No drug (Reference group)	-	-
2 (n = 6)	SD	1 mg/mL in PBS pH 7.4	1 mL
3 (n = 6)	MLT	0.5 mg/mL in PBS pH 7.4	1 mL
4 (n = 6)	SD (a) + MLT (b)	2 mg/mL (a) 1 mg/mL (b)	0.5 mL + 0.5 mL

SD (Sodium Diclofenac); MLT (Melatonin).

2.2.1. HPLC-UV Procedure and Instrumentation

The HPLC equipment consisted of a Waters® Alliance 2695 Separation Module (Waters Co., Milford, MA, USA) with a 2996 Photodiode Array Detector (DAD) at a wavelength range of 190–800 nm and sensitivity settings from 0.0001 to 2.0000 absorbance units. HPLC parameters are listed below.

SD analysis was conducted with a reverse-phase column ultrabase Nova-Pak C18, 60 Å, (150 mm × 3.9 mm; diameter of 4 µm (Waters, Barcelona, Spain) with a UV detector set up at 276 nm. The mobile phase, previously filtered by a 0.45 µm nylon membrane filter (Technokroma, Barcelona, Spain) and degassed by sonication, consisted of a 68:32 ratio of MeOH and H₃PO₄ (pH of 3.2) under isocratic elution at a flow rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 50 µL.

2.2.2. Validation and Verification of Analytical Methods

Previously validated HPLC-UV method was selected for the analysis of SD. Considering that the samples were obtained from biological sources, the specificity was studied. Specificity, expressed by the ICH guidelines as the ability to assess an analyte in the presence of components, which may be expected to be present, was evaluated by the absence of interference of the phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and other components from biological membranes used as a blank at the retention times shown by the different standard solutions.

2.2.3. Sample Analysis

The cumulative amount of SD, alone or in combination with MLT, through the small intestine membrane from the acceptor compartment was monitored by a validated HPLC-UV methodology. Results are reported as mean ± SD of six experiments (*n* = 6).

2.2.4. Data Treatment and Statistical Analysis

The permeability model has the same structure as the two-compartment classic model, composed of donor (apical) and receptor (basal) chambers, both separated by the permeation membrane. So, apical-to-basal Papp was calculated based on classic parameters according to Equation (1):

$$P_{app} = (dQ/dt)/(C_0 \times A), \quad (1)$$

where (dQ/dt) is the transport rate or flux (J) (µg/min) across the biological membrane, C₀ (µg/mL) is the initial concentration of the drug in the donor chamber, and A is the surface area (cm²) of the permeation membrane.

The cumulative amount (Q; µg) permeated through porcine duodenum was obtained by multiplying the acquired concentration (µg/mL) of SD at the receptor chamber and the volume (mL) of the receptor chamber. J (µg/min) was calculated as the slope at the steady state obtained by linear regression analysis (GraphPad Prism® software, v. 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) of Q as a function of time (min). Then, Papp (cm/min) was calculated according to Equation (1) by dividing the J (µg/min), the permeation area (A; 2.54 cm²), and the initial drug concentration (C₀; µg/mL = µg/cm³) in the donor chamber. Finally, the units were expressed in centimeters per second.

Obtained experimental data were analyzed by unpaired Student's *t*-test to compare Papp values for both SD Papp alone and SD Papp in presence of MLT. A *p*-value < 0.05 was established as an indicator of statistically significant differences.

2.3. In Vivo Studies: Oral Administration of NSAID and MLT in Mice

In vivo studies were carried out in both, female and male, *Mus musculus* mice weighing 25 ± 2 g. The mice were maintained in a controlled environment at (20 ± 1) °C for 7 days with a 12-h light/dark cycle and 50% ± 5% relative humidity throughout the experimental period. All mice were allowed free access to water and chow diet.

The nasogastric administration of SD therapeutic dose was carried out once per day for 7 days alone or in combination with MLT. No drug was administered to the reference or control group. Table 2 summarizes different experimental groups:

Table 2. In vivo experimental groups.

Group number	Group	Administered Drugs	Dose
1 (n = 6)	REF	No drug (Reference group)	-
2 (n = 6)	SD	Sodium Diclofenac	2.5 mg/kg
3 (n = 6)	MLT	Melatonin	10 mg/kg
4 (n = 6)	SD + MLT	Sodium Diclofenac and Melatonin	2.5 mg/kg and 10 mg/kg

REF (Reference group); SD (Sodium Diclofenac); MLT (Melatonin).

At the end of the experiment, eighth day, mice were euthanized. The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Spain) and the Committee of Animal Experimentation of the regional autonomous government of Catalonia (Spain) 491/18 approved on September 2019.

Intestine and stomach samples were prepared, according Sections 2.4 and 2.5, to perform histological analysis, COX-2 and iNOS determination.

2.4. Histological Analysis

For histological observation of stomach and intestinal architecture, hematoxylin and eosin staining were performed. For pork intestines, following the intestinal permeation study in Franz diffusion cells the samples were fixed in 4% buffered formaldehyde at room temperature. Mice stomachs and intestine were excised immediately after sacrifice and fixed in 4% buffered formaldehyde at room temperature. After fixation, all samples were paraffin embedded onto cassettes, sectioned into 5 µm slices, mounted on microscope slides and stained with hematoxylin and eosin, and finally viewed under a microscope Olympus BX41 and camera Olympus XC50 (Olympus, Barcelona, Spain).

2.5. COX-2 and iNOS Determination

COX-2 and iNOs determination was carried out by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), with this purpose RNA isolation was firstly carried out.

2.5.1. RNA Isolation

Total RNA from the intestine pig, intestine and stomach mice tissues was isolated using TRIzol® method (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). Small tissue fragments were homogenized using 1 mL of cold TRIzol reagent and 3 min under the Polytron™ Homogenizer PT1200E (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). Then, instructions described by the manufacturer were followed. RNA concentration and quality were tested by NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain).

2.5.2. RT-qPCR

One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA using the RevertAid First Strand cDNA synthesis kit. Subsequently, qPCR was performed using the Step One Plus Real Time PCR (Applied Biosystem) and primers for COX-2 (*Sus scrofa*: Forward 5'-GGAGAGACAGCATAAACTGC-3' and Reverse 5'-GTGTGTAAACTCAGCAGCA-3'; *Mus musculus*: Forward 5'-CCACTTCAAGGGAGTCTGGA-3' and Reverse 5'-AGTCATCTGCTACGGGAGGA-3') and iNOS (*Sus scrofa*: Forward 5'-CAACAATGGCAACATCAGG-3' and Reverse 5'-CATCAGGCATCTGGTAGC-3'; *Mus musculus*: Forward 5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3' and Reverse 5'-GTGGACGGGTCGATGTAC-3'). β-actin was used as housekeeping and PCR cycling conditions included: 5 min at 94 °C for

denaturalization, 30 cycles of amplification at 72 °C for 2 min, 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C, and a last cycle at 72 °C for 10 min for final extension. Then, Ct values of each sample were recorded, and data were analyzed by normalization to the internal control values using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Table 3 summarizes primers sequences.

Table 3. Primer sequences used for real time PCR in *Sus scrofa* and *Mus musculus*.

Primer	Animal Model	Sequence (5' to 3')	Acc. Number
COX-2	<i>Sus scrofa</i>	FW: GGAGAGACAGCATAAACTGC RV: GTGTGTTAAACTCAGCAGCA	AF207824
	<i>Mus musculus</i>	FW: CCAC TTCAAGGGAGTCTGGA RV: AGTCATCTGCTACGGGAGGA	NM_011198.4
iNOS	<i>Sus scrofa</i>	FW: CAACAATGGCAACATCAGG RV: CATCAGGCATCTGGTAGC	U59390
	<i>Mus musculus</i>	FW: GTTCTCAGCCCAACAATAACAAGA RV: GTGGACGGGTCGATGTCAC	NM_010927
β -actin	<i>Sus scrofa</i>	FW: GACATCCGCAAGGACCTCTA RV: ACACGGAGTACTTGCGCTCT	DQ845171
	<i>Mus musculus</i>	FW: GGCCGGGACCTGACAGACTACCTC RV: GTCACGCACGATTCCCTCTCAGC	NM_007393

2.5.3. Data Treatment and Statistical Analysis

COX-2 and iNOS results were evaluated statistically by ANOVA followed of Dunnett's Multiple Comparison Test using GraphPad® Prism 5.01 software; all the samples were compared with control one. p value from 0.01 to 0.05, 0.01 to 0.001, and $p < 0.001$ were considered statistically significant, very significant and extremely significant, respectively. Asterisks indicate statistical significance. (* $p < 0.05 > 0.01$; ** $p < 0.01 > 0.001$; and *** $p < 0.001$).

3. Results

3.1. Obtained Kinetics Parameters, Papp Calculation, and Statistical Analysis

Figure 3 shows SD cumulative permeated amounts in micrograms as a function of time (min) in steady state, for both, SD alone and SD permeated in presence of MLT. The kinetics parameters and Papp values of SD alone and in presence of MLT and statistical correlation between both are summarized in Table 4, which shows that no statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed correlating Papp values.

Table 4. Permeation parameters for SD alone and in presence of MLT in vertical Franz cells ($n = 6$) and statistical correlation between different Papp obtained values. Papp values are expressed as mean \pm SD.

Permeation Parameters	SD Alone	SD+MLT	Unpaired t -Test (p)
Flux ($\mu\text{g}/\text{min}$)	1.21 \pm 0.11	1.39 \pm 0.20	-
Flux/sup ($\mu\text{g}/(\text{cm}/\text{min})$)	0.48 \pm 0.04	0.55 \pm 0.10	-
Co ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1000	1000	-
P_{app} ($\times 10^{-6}$) (cm/s)	7.92 \pm 0.73	9.12 \pm 0.13	0.078 (>0.05)

Abbreviation: P_{app} —apparent permeability coefficient; SD—Sodium Diclofenac; MLT: Melatonin.

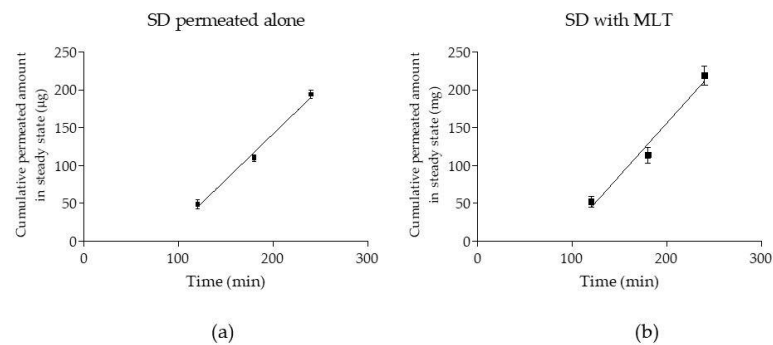


Figure 3. Cumulative permeated amounts (μg) as a function of time (min) in steady state of SD alone (a) and in the presence of melatonin (MLT) and (b) results are reported as mean \pm SD ($n = 6$).

3.2. Histological Results: Pig Intestine and Mice Stomach and Intestine

To investigate the possible preventive effect of MLT when administered with SD the stomach and intestine architecture were studied. The pig intestine of the permeation *ex vivo* studies was stained and studied under microscope. As shown in Figure 4, a section of the small intestine without treatment (Figure 4A) showed intact layers consisting of the mucosa and the submucosa. Intestine treated with MLT (Figure 4B) showed a similar pattern of the control conditions with relatively intact villi with normal adjacent structures.

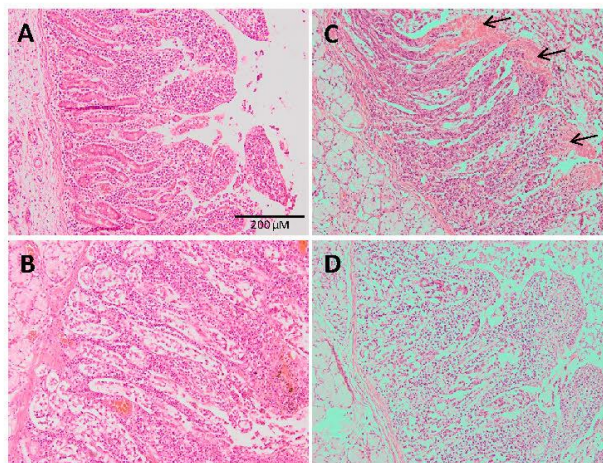


Figure 4. Histological analysis of intestine structure. Photomicrographs of hematoxylin- and eosin-stained sections of pig small intestine without treatment (A) or treated with MLT; (B) with SD; (C) or with SD + MLT; and (D) the effect on the histological architecture of the products was evaluated on the freshly excised pork intestine. $\times 100$ magnification, scale bar = 200 μm . Arrow indicates alteration of villi.

However, when the intestine was treated with SD (Figure 4C), damage to the tips of the intestinal villi could be observed. Abnormal epithelial cells are indicated with arrows. On the contrary, when the intestine was treated with SD together with MLT no relevant histopathologic changes were noticed suggesting an improvement of the intestinal injury due to SD thus preventing the damage.

Regarding the in vivo studies, as shown in Figure 5, section of the mice stomach without treatment (Figure 5A) showed intact layers consisting of the mucosa and the submucosa. Samples treated with MLT (Figure 5B) showed a similar pattern of the control conditions. The results show that SD altered stomach mucosa and induced tissue damage as it can be shown by the leucocyte infiltrate (Figure 5D), which was prevented when MLT was administered (Figure 5C). For the mice intestinal architecture little alterations were observed with the anti-inflammatory drug alone (Figure 5H) or in combination with MLT (Figure 5G).

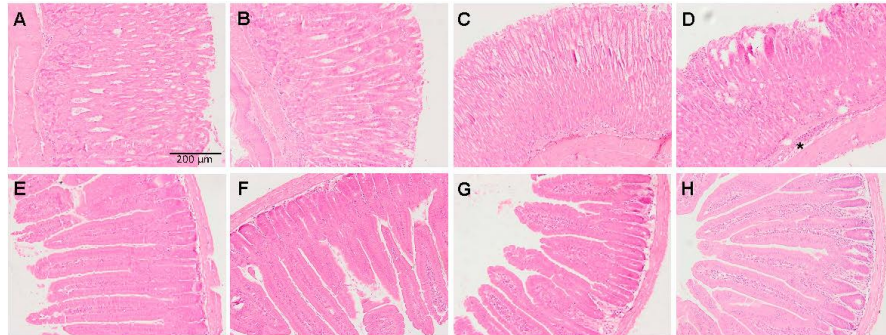


Figure 5. Representative micrographs of hematoxylin and eosin staining of tissue sections corresponding to the different treatments and structures: Stomach samples from mice without treatment (A) MLT; (B) SD + MLT; (C) or SD; (D) small intestine from mice without treatment; (E) MLT; (F) SD + MLT; (G) or SD; and (H) the effect on the histological architecture of the products was evaluated on the stomach and intestine from p.o. administered mice. $\times 100$ magnification, scale bar = 200 μm . * indicates leucocyte infiltration.

3.3. COX-2 and iNOs Levels

COX-2 and iNOs obtained levels in duodenum samples of *Sus scrofa* are reported in Figure 6, which shows that comparison between iNOS levels in samples corresponding to MLT and control resulted in statistically very significant differences (** $p < 0.01 > 0.001$) and extremely significant (***) $p < 0.001$) in the case of SD with MLT samples. On behalf of COX-2 extremely significant differences (***) $p < 0.001$) were observed for SD, MLT, and SD with MLT.

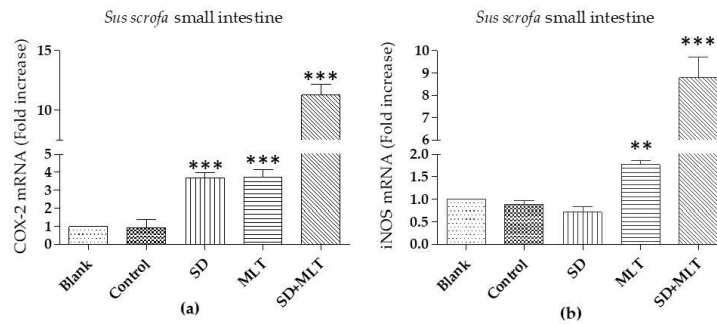


Figure 6. Comparative levels of COX-2 (a) and iNOS; and (b) mRNA in duodenum of *Sus scrofa*. Data are expressed as mean \pm SD. ** $p < 0.01 > 0.001$; and *** $p < 0.001$. SD (Sodium diclofenac); MLT (Melatonin).

COX-2 and iNOs obtained levels for *Mus musculus* duodenum (intestine) and stomach are summarized in Figures 7 and 8 respectively. Concerning mice intestine no differences statistically significant ($p > 0.05$) were observed for different samples, for both COX-2 and iNOS levels.

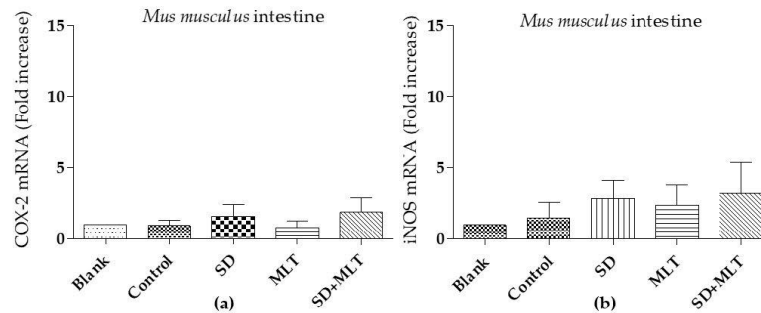


Figure 7. Comparative levels of COX-2 (a) and iNOS; and (b) mRNA in duodenum of *Mus musculus*. Data are expressed as mean \pm SD. MLT (Melatonin); SD (Sodium diclofenac).

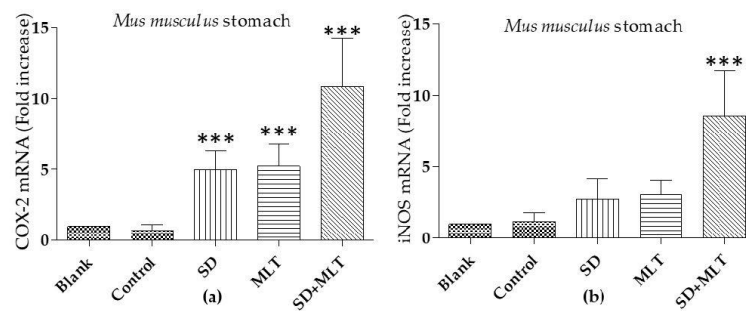


Figure 8. Comparative levels of COX-2 (a) and iNOS; and (b) mRNA in the stomach of *Mus musculus*. Data are expressed as mean \pm SD. *** $p < 0.001$. SD (Sodium diclofenac); MLT (Melatonin).

Observed levels for COX-2 in *Mus musculus* stomach samples for SD, MLT, and SD with MLT were extremely significant (***) $p < 0.001$) different from control. With regard to iNOS only SD with MLT samples lead to extremely significant (***) $p < 0.001$) differences when compared to control.

4. Discussion

Differences between gastric and intestinal damages caused by SD for an in vivo study are related to the pH of the tissue and the pKa the NSAID. As previously discussed, there is a highly significant inverse correlation between pKa and concentration required for maximum stimulation of mitochondrial oxidative stress, the lower pH of the stomach together with increased acid secretion and decreased gastric fluid volume cause by SD may lead in higher damages in mice stomach than in small intestine.

As summarized in Figure 9, the observed prevention of GI damage caused by MLT may be involved in multiple pathways.

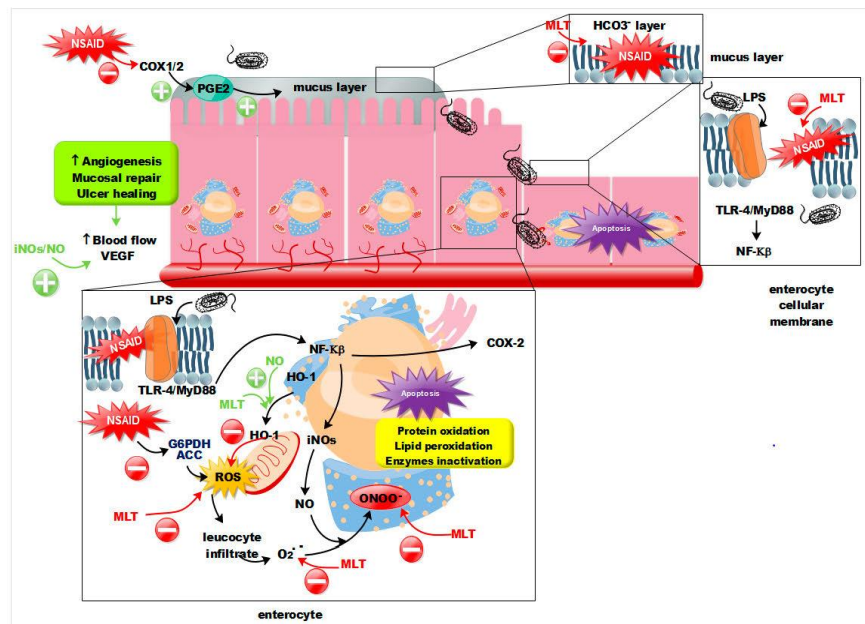


Figure 9. Summarized MLT multipathways action mechanism to prevent GI injuries caused by NSAIDs.

The amphiphilic nature of MLT, which has lipophilic [55] and hydrophilic groups [56], allows it to interact with PC based membranes [57] or lipidic membranes [58], in fact MLT crosses all the biological membranes including the blood brain barrier [59] and as a result of such an interaction MLT shows a role in preserving the integrity, permeability, and functionality of cell membranes [60,61], therefore at the GI level MLT may interact with enterocyte cellular membrane decreasing the NSAIDs damage. Additionally, MLT showed a stimulant effect of mucosal bicarbonate secretion [62], so MLT may also protect the HCO_3^- mucus layer.

The raised levels of iNOS in samples treated with MLT together with SD are indicative of higher NO expression; NO may be intermediate of mucosal repair by increasing angiogenesis and blood flow, since MLT improves enterocyte redox state at different levels working as scavenger of ROS (O_2^-), avoiding the interaction between NO and ROS, and ONOO^- production ultimately. Furthermore, increased levels of COX-2 in mice samples treated with MLT together with SD are indicative of increased levels of PGI_2 , which inhibits the in vivo gastric acid secretion and enhances mucosal blood flow [10] that would add to the effect of NO on the inhibition of gastric acid secretion [35].

An alternative mechanism to the scavenger action of MLT protective agent is related with the heme oxygenase 1 (HO-1), this enzyme encoded by the *Hmox1* gene, is 32-kDa stress protein induced in human cells by a variety of stress treatments. [63] The induction of this enzyme is part of a protective response against oxidative damage via down-regulation of reactive oxygen species generation [64]. The translocation from endoplasmic reticulum to mitochondria of HO-1 was shown as a novel cytoprotective mechanism against NSAIDs drug-induced oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury [65] and MLT was proved to be an enhancer of HO-1 activity [66] so one of the cellular pathways involved in the protective effect of MLT against GI mucosal damage may be related with the enhancement of this protective enzyme.

Increased levels of COX-2 in samples where MLT prevented SD damages, may be related with the wound healing effect of COX-2 in enterocytes [17] and with an increased mucosal blood flow [10].

Results show the role of MLT in tissue damage prevention at intestinal level in the ex vivo model and at gastric level in the in vivo experiment. Despite of higher levels of COX-2 and iNOS in the samples treated with MLT together with SD, they showed a prevention of GI damage, as discussed, this prevention is mainly due to the antioxidant effect of MLT that improves and contributes to a favorable redox status of enterocyte; although the increasing mechanism for both enzymes is unclear, because other authors relate MLT to the inhibition of COX-2 and iNOS in different cells (murine macrophage cell line, RAW 264.7) [67]. With respect to the preventive effect, all of our results of the individuals within a group were homogenous and male and female results were considered together, however some authors found that sexual hormones could influence the healing process of preexisting ulcers [68]. Other study showed that ovarian sex hormones neither worsen nor protect against aspirin-induced gastric lesions in female rats [69].

Permeation results show that MLT would slightly increase SD Papp but according to statistical correlation, the difference is not statistically significant ($p > 0.05$), therefore a joint administration of both drugs may not affect SD absorption.

5. Conclusions

Our investigation contributes the study of the effect of MLT as a preventive agent of GI damage caused by SD in an ex vivo model and the study of the effect of MLT as a preventive agent of GI damage when administered jointly to SD over a period of 7 days in a mice in vivo model.

MLT showed a preventive effect of GI lesions induced by SD. Numerous pathways would outline as responsible for this effect, the direct inhibition of ROS and as consequence the inhibition of all the derived molecules that cause GI damage, the enhancement of mitochondrial protection factor HO-1 and a protective role on the phospholipids as PC of the GI membrane and mucus layer.

Future research could focus on a deeply study of MLT as an alternative to classical therapies based on PPI in the prevention of GI damage caused by NSAIDs.

Author Contributions: Conceptualization, B.C., A.C.C. and A.B.S.; methodology, B.C., A.C.C., M.J.R.-L. and M.J.F. and A.B.S.; software A.B.S. and M.J.F.; formal analysis, A.B.S., M.J.R.-L. and M.J.F.; investigation, A.B.S.; data curation, A.B.S. and A.C.C.; writing—original draft preparation, A.B.S.; writing—review and editing, B.C. and A.B.S.; supervision, B.C. and A.C.C.; project administration, B.C. and A.C.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We would like to thank Álvaro Gimeno Sandig, director of Animal House Bellvitge of University of Barcelona and Lidia Gómez Segura from the Ethical Committee of Animal Experimentation at the University of Barcelona for their contribution in the Animal Experimentation protocol design.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kargman, S.; Charleson, S.; Cartwright, M.; Frank, J.; Riendeau, D.; Mancini, J.; O'Neill, G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* **1996**, *111*, 445–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fitzpatrick, F.A. Cyclooxygenase enzymes: Regulation and function. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 577–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Simmons, D.L.; Botting, R.M.; Hla, T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 387–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Singer, I.I.; Kawka, D.W.; Schloemann, S.; Tessner, T.; Riehl, T.; Stenson, W.F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 297–306. [[CrossRef](#)]
5. Xie, W.L.; Chipman, J.G.; Robertson, D.L.; Erikson, R.L.; Simmons, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *PNAS* **1991**, *88*, 2692–2696. [[CrossRef](#)]

6. Robert, A.; Nezamis, J.E.; Lancaster, C.; Hanchar, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* **1979**, *77*, 433–443. [[CrossRef](#)]
7. Wilson, D.E.; Phillips, C.; Levine, R.A. Inhibition of gastric secretion in man by prostaglandin A1. *Gastroenterology* **1971**, *61*, 201–206. [[CrossRef](#)]
8. Main, I.H.M.; Whittle, B.J.R. The effects of E and A prostaglandins on gastric mucosal blood flow and acid secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1973**, *49*, 428–436. [[CrossRef](#)]
9. Jackson, L.M.; Wu, K.; Mahida, Y.R.; Jenkins, D.; Donnelly, M.T.; Hawkey, L.C.J. Cox-1 expression in human gastric mucosa infected with helicobacter pylori: Constitutive or induced? *Gut* **2000**, *47*, 762–770. [[CrossRef](#)]
10. Whittle, B.; Boughton-Smith, N.K.; Moncada, S.; Vane, J.R. Actions of prostacyclin (PGI₂) and its product 6-oxo-PGF₁ on the rat gastric mucosa in vivo and vitro. *Prostaglandins* **1978**, *15*, 955–967. [[CrossRef](#)]
11. Masferrer, J.L.; Isakson, P.C.; Seibert, K. Cyclooxygenase-2 inhibitors: A new class of anti-inflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **1996**, *25*, 363–372. [[CrossRef](#)]
12. Kearney, P.M.; Baigent, C.; Godwin, J. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* **2006**, *332*, 1302–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. McGettigan, P.; Henry, D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: A systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* **2006**, *296*, 1633–1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Majed, B.H.; Khalil, R.A. Molecular Mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 540–582. [[CrossRef](#)]
15. Langenbach, R.; Morham, S.G.; Tian, H.F.; Loftin, C.D.; Ghanayem, B.I.; Chulada, P.C.; Smithies, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* **1995**, *83*, 483–492. [[CrossRef](#)]
16. Langenbach, R.; Loftin, C.; Lee, C.; Tian, H. Cyclooxygenase knockout mice. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *58*, 1237–1246. [[CrossRef](#)]
17. Karrasch, T.; Steinbrecher, K.A.; Allard, B.; Baldwin, A.S.; Jobin, C. Wound-induced p38MAPK-dependent histone H3 phosphorylation correlates with increased COX-2 expression in enterocytes. *J. Cell Physiol.* **2006**, *207*, 809–815. [[CrossRef](#)]
18. Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Umeda, M.; Takeuchi, K. Protective effect of lafutidine against indomethacin-induced intestinal ulceration in rats: Relation to capsaicin-sensitive sensory neurons. *Digestion* **2000**, *61*, 39–46. [[CrossRef](#)]
19. Lichtenberger, L.M.; Wang, Z.M.; Romero, J.J.; Ulloa, C.; Perez, J.C.; Giraud, M.N.; Barreto, J.C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: Insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 154–158. [[CrossRef](#)]
20. Lichtenberger, L.M.; Zhou, Y.; Jayaraman, V.; Doyen, J.R.; O’Neil, R.G.; Dial, E.J.; Volk, D.E.; Gorenstein, D.G.; Boggara, M.B.; Krishnamoorti, R. Insight into NSAID-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: Characterization of interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* **2012**, *1821*, 994–1002. [[CrossRef](#)]
21. Bernhard, W.; Postle, A.D.; Linck, M.; Sewing, K.F. Composition of phospholipid classes and phosphatidylcholine molecular species of gastric mucosa and mucus. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* **1995**, *1255*, 99–104. [[CrossRef](#)]
22. Scheiman, J.M.; Hindley, C.E. Strategies to optimize treatment with NSAIDs in patients at risk for gastrointestinal and cardiovascular adverse events. *Clin. Ther.* **2010**, *32*, 667–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Watanabe, T.; Higuchi, K.; Kobata, A.; Nishio, H.; Tanigawa, T.; Shiba, M.; Arakawa, T. Intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* **2008**, *57*, 181–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xia, Y.; Liu, L.; Zhong, C.; Geng, J. NF-KB activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 851–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Konaka, A.; Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Korolkiewicz, R.; Takeuchi, K. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol. Res.* **1999**, *40*, 517–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Kobayashi, O.; Miwa, H.; Watanabe, S.; Tsujii, M.; Dubois, R.N.; Sato, N.; Dubois, R.N. Cyclooxygenase-2 downregulates inducible nitric oxide synthase in rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *281*, 688–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Asensio, C.; Levoine, N.; Guillaume, C.; Guerquin, M.J.; Rouguie, K.; Chrétien, F.; Lapique, F. Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: A key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs? *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 405–416. [[CrossRef](#)]
28. Macpherson, A.; Rafi, S.; Mahmood, T.; Hayllar, J.; Jacob, M.; Scott, D.; Wrigglesworth, J.M. Mitochondrial damage: A possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* **2010**, *41*, 344–353.
29. Basivireddy, J.; Vasudevan, A.; Jacob, M.; Balasubramanian, K.A. Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 339–349. [[CrossRef](#)]
30. Mahmud, T.; Rafi, S.S.; Scott, D.L.; Wrigglesworth, J.M.; Bjarnason, I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Arthritis Rheum.* **1996**, *39*, 1998–2003. [[CrossRef](#)]
31. Maharaj, A.S.; D’Amore, P.A. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc. Res.* **2007**, *74*, 100–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **2004**, *75*, 639–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Laszlo, F.; Whittle, B.J.R. Role of nitric oxide and platelet-activating factor in the initiation of indomethacin-provoked intestinal inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *344*, 191–195. [[CrossRef](#)]
34. Khattab, M.M. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol. Res.* **2001**, *43*, 463–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kato, S.; Kitamura, M.; Korolkiewicz, R.P.; Takeuchi, K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: Effects of NO donors and NO synthase inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, 839–846. [[CrossRef](#)]
36. Lee, M.; Kallal, S.M.; Feldman, M. Omeprazole prevents indomethacin-induced gastric ulcers in rabbits. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1996**, *10*, 571–576. [[CrossRef](#)]
37. Fornai, M.; Natale, G.; Colucci, R.; Tuccori, M.; Carazzina, G.; Antonioli, L.; Del Tacca, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* **2005**, *372*, 79–87. [[CrossRef](#)]
38. Fornai, M.; Colucci, R.; Antonioli, L.; Awwad, O.; Ugolini, C.; Tuccori, M.; Blandizzi, C. Effects of esomeprazole on healing of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers in the presence of a continued NSAID treatment: Characterization of molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63*, 59–67. [[CrossRef](#)]
39. Rodriguez-Stanley, S.; Redinger, N.; Miner, P.B. Effect of naproxen on gastric acid secretion and gastric pH. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *23*, 1719–1724. [[CrossRef](#)]
40. Pearson, S.P.; Kelberman, I. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *Postgrad. Med.* **1996**, *100*, 131–143. [[CrossRef](#)]
41. Li, Y.; Soendergaard, C.; Bergenheim, F.H.; Aronoff, D.M.; Milne, G.; Riis, L.B.; Nielsen, O.H. COX-2-PGE2 signaling impairs intestinal epithelial regeneration and associates with TNF inhibitor responsiveness in ulcerative colitis. *EBioMedicine* **2018**, *36*, 497–507. [[CrossRef](#)]
42. Petruzzelli, M.; Vacca, M.; Moschetta, A.; Cinzia Sasso, R.; Palasciano, G.; van Erpecum, K.J.; Portincasa, P. Intestinal mucosal damage caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Role of bile salts. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Poplawski, C.; Sosnowski, D.; Szaflarska-Popławska, A.; Sarosiek, J.; McCallum, R.; Bartuzi, Z. Role of bile acids, prostaglandins and COX inhibitors in chronic esophagitis in a mouse model. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 1739–1742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Barrios, J.M.; Lichtenberger, L.M. Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAIDs injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology* **2000**, *118*, 1179–1186. [[CrossRef](#)]
45. Savarino, V.; Dulbecco, P.; Savarino, E. Are proton pump inhibitors really so dangerous? *Dig. Liver Dis.* **2016**, *48*, 851–859. [[CrossRef](#)]
46. Seekatz, A.M.; Schnitzlein, M.K.; Koenigsnecht, M.J.; Baker, J.R.; Bleske, B.E.; Young, V.B. Spatial and temporal analysis of the stomach and small-intestinal microbiota in fasted healthy humans. *mSphere* **2019**, *4*, e00126-19. [[CrossRef](#)]

47. Lo, W.K.; Chan, W.W. Proton pump inhibitor use and the risk of small intestinal bacterial overgrowth: A meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *11*, 483–490. [[CrossRef](#)]
48. Miazga, A.; Osiński, M.; Cichy, W.; Żaba, R. Advances in medical sciences current views on the etiopathogenesis, clinical manifestation, diagnostics, treatment and correlation with other nosological entities of SIBO. *Adv. Med. Sci.* **2015**, *60*, 118–124. [[CrossRef](#)]
49. Daniell, H.W. Acid suppressing therapy as a risk factor for Candida esophagitis. *Dis. Esophagus* **2016**, *29*, 479–483. [[CrossRef](#)]
50. Jung, S.B.; Nagaraja, V.; Kapur, A.; Eslick, G.D. Association between vitamin B12 deficiency and long-term use of acid-lowering agents: A systematic review and meta-analysis. *Intern. Med. J.* **2015**, *45*, 409–416. [[CrossRef](#)]
51. Sánchez, A.; Calpena, A.C.; Clares, B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 16981–17004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Adeyeye, C.M.; Li, P.K. Diclofenac sodium. In *Analytical Profiles of Drug Substances*; Florey, K., Ed.; Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA, 1990; Volume 19, pp. 123–144.
53. Mei, Q.; Diao, L.; Xu, J.; Liu, X.; Jin, J. A protective effect of melatonin on intestinal permeability is induced by diclofenac via regulation of mitochondrial function in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* **2011**, *32*, 495–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sánchez, A.B.; Calpena, A.C.; Mallandrich, M.; Clares, B. Validation of an ex vivo permeation method for the intestinal permeability of different BCS drugs and its correlation with caco-2 in vitro experiments. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Reiter, R.J. Pineal Melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **1991**, *12*, 151–180. [[CrossRef](#)]
56. Shida, C.S.; Castrucci, A.M.; Lamy-Freund, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* **1994**, *16*, 198–201. [[CrossRef](#)]
57. Munford, M.L.; Pasa, A. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. *J. Pineal Res.* **2010**, *49*, 169–175.
58. Dies, H.; Cheung, B.; Tang, J.; Rheinstädter, M.C. The organization of melatonin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 1032–1040. [[CrossRef](#)]
59. Johns, J. Estimation of melatonin blood brain barrier permeability. *J. Biophys. Biomed.* **2011**, *3*, 64–69. [[CrossRef](#)]
60. Alluri, H.; Wilson, R.L.; Shaji, C.A.; Wiggins, K. Melatonin preserves blood-brain barrier integrity and permeability via matrix metalloproteinase-9 inhibition. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154427. [[CrossRef](#)]
61. Reiter, R.J.; Fuentes-broto, L.; Paredes, S.D.; Tan, D.; Garcia, J.J. Melatonin and the pathophysiology of cellular membranes. *Marmara Pharm. J.* **2010**, *14*, 1–9. [[CrossRef](#)]
62. Res, P. Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J. Pineal Res.* **2003**, *34*, 288–293.
63. Keyse, S.M.; Tyrrell, R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *PNAS* **2006**, *86*, 99–103. [[CrossRef](#)]
64. Kim, H.J.; So, H.S.; Lee, J.H.; Lee, J.H.; Park, C.; Park, S.Y.; Park, R. Heme oxygenase-1 attenuates the cisplatin-induced apoptosis of auditory cells via down-regulation of reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1810–1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bindu, S.; Pal, C.; Dey, S.; Goyal, M.; Alam, A.; Iqbal, M.S.; Bandyopadhyay, U. Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39387–39402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wu, C.C.; Lu, K.C.; Lin, G.J.; Hsieh, H.Y.; Chu, P.; Lin, S.H.; Sytwu, H.K. Melatonin enhances endogenous heme oxygenase-1 and represses immune responses to ameliorate experimental murine membranous nephropathy. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 460–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Deng, W.; Tang, S.; Tseng, H.; Wu, K.K. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* **2006**, *108*, 518–524. [[CrossRef](#)]

68. Machowska, A.; Szlachcic, A.; Pawlik, M.; Brzozowski, T.; Konturek, S.J.; Pawlik, W.W. The role of female and male sex hormones in the healing process of preexisting lingual and gastric ulcerations. *J. Physiol. Pharmacol.* **2004**, *55* (Suppl. 2), 91–104.
69. Sangma, T.K.; Jain, S.; Mediratta, P.K. Effect of ovarian sex hormones on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric lesions in female rats. *Indian J. Pharmacol.* **2014**, *46*, 113–116.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El objetivo principal de la presente tesis ha sido el estudio de la MLT como posible agente preventivo del daño GI inducido por los AINE, para ello los objetivos secundarios se han estructurado en 3 fases de trabajo diferenciadas. La **primera fase** cuyos resultados se recopilan en el **Artículo 2**, ha consistido en el desarrollo y validación de un método o modelo *ex vivo* para la determinación de la permeación intestinal aparente (P_{app}) usando tejido intestinal (duodeno) de cerdo (*Sus scrofa*) y evaluar su correlación con cultivos celulares Caco-2. Este modelo *ex vivo* ha permitido establecer las condiciones necesarias para obtener el valor de P_{app} de fármacos de cada una de las clases biofarmacéuticas, así como evaluar los posibles cambios que pueden producirse en dicho valor derivados de la permeación concomitante con la MLT en la fase 3. También en la fase 3, se ha utilizado este modelo en la evaluación del daño tisular *ex vivo*.

En la **segunda fase** se seleccionó el modelo animal y se realizó una revisión bibliográfica, publicada en el **Artículo 1**, de la actividad de la MLT como antioxidante y su papel en distintas enfermedades relacionadas con la inflamación, para seleccionar los marcadores bioquímicos más adecuados que permitiesen evaluar la acción de la MLT como agente preventivo del daño GI.

Por último, en la **tercera fase** se evaluó la actividad de la MLT como agente preventivo del daño GI, para ello tras seleccionar el AINE más adecuado como modelo de daño GI, se utilizó en primer lugar el método *ex vivo* desarrollado en el **Artículo 2** y a continuación el modelo animal *in vivo* seleccionado en la segunda fase. Evaluándose los distintos marcadores que habían sido seleccionados en la segunda fase. Los resultados se recopilan en el **Artículo 3**.

Fase 1. Desarrollo y validación de un método o modelo ex vivo para la determinación de cinética de absorción y/o permeación intestinal y estudio de su correlación con células Caco-2.

En primer lugar, se llevó a cabo una revisión bibliográfica para seleccionar 4 fármacos de cada una de las clases (I-IV) de la clasificación Biofarmacéutica, los 4 fármacos seleccionados fueron para la clase I, el KT, para la clase II la MLT, para la clase III la HTZ y la FUR como clase IV. Para diseñar los experimentos de permeación *ex vivo* en primer lugar se llevaron a cabo estudios de solubilidad en el medio de permeación, PBS pH 7,4, y se seleccionaron las concentraciones adecuadas de las soluciones a permear

para asegurar las condiciones sumidero o condiciones “*sink*”. Como membrana de permeación se seleccionó el duodeno de cerdo (*Sus scrofa*), sección del intestino delgado en la que se produce la absorción de la mayoría de los fármacos, por su similitud con el intestino humano en cuanto a características histológicas y fisiológicas, además desde el punto de vista morfológico el grosor del intestino permitió utilizar células de difusión de Franz, tal y como se muestra en el artículo 2. Esta técnica no se había llevado a cabo hasta el momento, lo que refuerza el carácter innovador del trabajo, fue puesta a punto llevando a cabo distintas permeaciones con cada una de las moléculas seleccionadas. Los resultados obtenidos de P_{app} para los fármacos de distinta clase biofarmacéutica fueron comparados desde el punto de vista estadístico con los valores para estas moléculas obtenidas en ensayos con Caco-2. Los resultados mostraron que la permeación *ex vivo* es un método equivalente a la permeación en cultivos celulares Caco-2 para el KT, HTZ y la FUR de la clasificación biofarmacéutica 1, 3 y 4, respectivamente. Con respecto a la MLT, los valores de P_{app} obtenidos con nuestro método *ex vivo* si mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los datos de permeación en Caco-2, concretamente fueron 1.79 veces más bajos que en la técnica de cultivo celular. Esta diferencia podría estar relacionada con la acumulación de MLT en las células intestinales descrita en mamíferos (Lee y cols., 1995), los receptores MT1 y MT2 situados en esta región están involucrados en múltiples funciones, como la regulación de la motilidad y la permeabilidad epitelial (Söderquist y cols., 2015). También podría explicarse por el hecho de que la MLT, aunque exhibe transporte mediado por proteínas (Mayo y cols., 2018), reduce la permeabilidad paracelular epitelial duodenal (Res, 2013). Esto justificaría el valor de P_{app} de $2,31 \pm 0,12 \times 10^{-6}$ cm/s ($n = 4$) para MLT obtenido por otros autores en una permeación *ex vivo* a través de yeyuno de rata en cámaras de difusión (Tran y cols., 2009), el cual también es un valor estadísticamente diferente a los obtenidos en estudios de permeación con Caco-2. Por último, la diferencia también podría estar asociada con la citotoxicidad que la MLT ha demostrado provocar a concentraciones entre 1,56 y 0,78 g/ml en cultivos celulares Caco-2 (Batista y cols., 2014), se ha observado daño ultraestructural que en una estructura simple como una monocapa de células daría lugar al aumento de la permeabilidad a través de las uniones estrechas, dando lugar a un mayor valor de P_{app} . Estas circunstancias explicarían la diferencia entre ambos métodos para esta molécula.

Podemos afirmar que la solubilidad del fármaco no es un factor limitante cuando se utiliza el método *ex vivo*, ya que la FUR, que es clase 4, mostró una buena correlación. En contraste, los fármacos que presenten fenómenos de membrana intestinal como acumulación o metabolismo (entre otros), sí serían limitantes a la hora de seleccionar este método para su correlación con Caco-2.

Fase 2. Selección del modelo animal y de los marcadores bioquímicos más adecuados para evaluar la acción de la melatonina como agente preventivo del daño gastrointestinal.

Dado que era necesario estudiar órganos y tejidos, y que el efecto a evaluar es resultado de la interacción de determinados fármacos administrados en un modelo complejo, que incluye absorción, distribución, interacción, metabolismo y excreción, fue imprescindible que el estudio se llevase a cabo en un modelo animal. Después de una revisión bibliográfica para seleccionar el modelo animal más adecuado, se decidió trabajar con ratón (*Mus musculus*), debido a su similitud en cuanto a estructuras y funciones intestinales con el humano. Es uno de los animales con menor desarrollo, pero con una microbiota GI relativamente similar a la humano que, además, tiene un pequeño tamaño y tiempo de vida corto en comparación con otros como el cerdo que facilita su alojamiento, su manipulación y las intervenciones.

Después de realizar una revisión bibliográfica de la actividad de la MLT como antioxidante y su papel en distintas enfermedades relacionadas con la inflamación, se identificó la COX-2 y la iNOS como los mejores marcadores bioquímicos a estudiar, ya que ambos tienen un papel tanto en la homeostasis como en el proceso inflamatorio, según las condiciones celulares, y por otro lado se trata de marcadores que tienen una permanencia adecuada en los tejidos, a diferencia de algunas IL cuya síntesis y degradación son muy rápidas.

Fase 3. Evaluación de la actividad de la melatonina como agente preventivo del daño gastrointestinal inducido por AINE.

Para evaluar el papel de MLT en la prevención de lesiones GI inducidas por AINE, se seleccionó el diclofenaco sódico (DS) como modelo de daño GI, entre las razones se incluye su valor de pK_A de 4,15 (Adeyeye y Li, 1999); tal y como se explica en la sección de mecanismo de daño GI, existe una correlación inversa significativa entre el pK_A y la

concentración requerida para la estimulación máxima del estrés oxidativo a nivel mitocondrial, cuanto mayor es el valor de pK_A , menor la concentración requerida para el máximo desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Maharaj y D'Amore, 2007). Por lo tanto, a pesar de que los datos de consumo a nivel global incluidos en la Tabla 2 de la sección de introducción, muestran que el AINE más consumido es el AAS, éste tiene un pK_A de 3,5, lo que se traduce en una concentración necesaria casi cuatro veces mayor de ASA para producir el mismo efecto que el DS. Además, otros autores estudiaron el papel de MLT para recuperar la permeabilidad intestinal después de un tratamiento con DS (Mei y cols., 2011), por lo que se confirmó como un modelo adecuado de lesión GI.

Una vez seleccionado el DS, se llevó a cabo la evaluación de la MLT como agente preventivo del daño GI inducido por dicho AINE usando el modelo *ex vivo* desarrollado en la fase 1, que permitió no solo evaluar marcadores bioquímicos e histológicos en intestino de cerdo (*Sus scrofa*), si no también posibles cambios en la permeabilidad del DS al permearse solo o junto con MLT. También se llevó a cabo el estudio *in vivo* en el modelo animal seleccionado en la fase 2, ratón (*Mus musculus*), para este modelo además de evaluarse desde el punto de vista histológico y bioquímico el estómago, también se evaluó el duodeno.

En cuanto a los resultados obtenidos del estudio histológico de las muestras de intestino de cerdo de las condiciones control, en las que se permeó el vehículo (PBS pH 7,4) sin tratamiento, se observaron capas intactas tanto de mucosa como de submucosa; al igual que para las muestras tratadas solo con MLT, en ambos casos se observaron vellosidades relativamente intactas y con estructuras adyacentes normales. Sin embargo, cuando el intestino fue tratado solo con DS, se observaron notables daños en los extremos de las vellosidades intestinales. Por el contrario, cuando el intestino se trató con DS junto con MLT, no hubo histopatología relevante, se observaron cambios que sugieren la prevención de la lesión intestinal inducida por el SD.

Con respecto a la evaluación histológica del estudio *in vivo* en ratón, tanto las muestras de estómago control como las tratadas solo con MLT, mostraron capas intactas de mucosa y submucosa. Si se observaron alteraciones en la mucosa estomacal y daño tisular, incluyendo infiltración leucocitaria, en las muestras de estómago de los individuos tratados en exclusividad con DS. Dichas lesiones fueron prevenidas con la administración

concomitante de MLT, en cuyas muestras no se observaron lesiones. En cuanto a la arquitectura intestinal de los ratones, se observaron pequeñas alteraciones en los individuos que recibieron solo el AINE, pero no hubo diferencias notables con aquellos que recibieron el DS junto con MLT. Estas diferencias entre los daños gástricos e intestinales causados por DS observadas en el estudio *in vivo* estarían relacionadas con el pH del tejido y el pK_A del AINE, dado que el pH es mayor en el intestino. Tal y como se discute anteriormente, existe una correlación inversa altamente significativa entre pK_A, y la concentración requerida para la estimulación máxima del estrés oxidativo mitocondrial, el pH más bajo del estómago junto con el aumento de la secreción de ácido y la disminución del volumen de líquido gástrico causada por DS provocarían daños mayores en estómago que en el intestino delgado del ratón. Aunque hay autores (García-Rayado, G., 2018) que sugieren una mayor prevalencia de los efectos adversos asociados a los AINE, incluidos los efectos clínicos y subclínicos en el tracto GI inferior, no es lo que hemos observado en nuestro estudio.

El efecto preventivo del daño GI inducido por el DS observado al administrar de forma concomitante la MLT involucraría varias vías o mecanismos de acción. Por un lado, la naturaleza anfifílica de la MLT que posee grupos lipófilos (Reiter, 1991) e hidrófilos (Shida, 1994), le permitiría interactuar con membranas celulares basadas en PC (Munford y Pasa, 2010) o membranas lipídicas (Dies y cols., 2015), de hecho, se sabe que la MLT es permeable a todas las membranas biológicas incluyendo la barrera hematoencefálica (Johns, 2011), como resultado de tal interacción, este antioxidante tendría un papel importante en la preservación de la integridad, la permeabilidad y la funcionalidad de la membranas celular (Alluri y cols., 2016; Reiter y cols., 2010), que a nivel GI se traduciría en una interacción con la membrana celular de los enterocitos y reduciría el daño provocado por el AINE.

Por otro lado, la MLT ha demostrado un efecto estimulante de la secreción de bicarbonato en la mucosa (Res, P., 2003) por lo que protege el HCO₃⁻ de la capa de moco.

En cuanto a los marcadores bioquímicos estudiados, en las muestras tratadas con MLT junto con DS se observaron niveles elevados de iNOS, lo que es indicativo de mayor expresión de NO, estos niveles, también explicarían la prevención en el daño tisular mediada por la MLT, ya que el NO tiene un papel diferente según el estado redox de la célula, en condiciones de bajo estrés oxidativo actúa como intermediario en la reparación

de la mucosa al aumentar la angiogénesis y el flujo sanguíneo. Dado que la MLT mejora el estado redox de los enterocitos, al eliminar los ROS (O_2^-), evita su interacción con el NO, y en última instancia la producción del ONOO $^-$.

Además, los niveles aumentados de COX-2 observados en las muestras de ratones tratados con MLT junto con DS son indicativos del aumento de los niveles de PGI $_2$, que inhibe la secreción de ácido gástrico *in vivo* y mejora del flujo sanguíneo de la mucosa (Whittle y cols., 1978), esto se sumaría al efecto del NO sobre la inhibición de la secreción de ácido gástrico y a la prevención del daño en la mucosa.

Un mecanismo alternativo a la acción como antioxidante directo de la MLT está relacionado con la *eme* oxigenasa 1 (HO-1), esta enzima codificada por el gen Hmox1, es una proteína de 32 kDa secretada por las células humanas ante una variedad de estímulos de estrés (Keyse y Tyrrell, 2006). La inducción de esta enzima es parte de una respuesta protectora contra el daño oxidativo a través de la regulación negativa en la generación de especies reactivas de oxígeno (Kim y cols., 2006). Se ha demostrado que la translocación de la HO-1 desde el retículo endoplásmico a las mitocondrias actúa como mecanismo citoprotector contra los AINE, el estrés oxidativo inducido por fármacos, la apoptosis y la lesión de la mucosa gástrica (Bindu y cols., 2011) y la MLT es un potenciador de la actividad HO-1 (Wu y cols., 2012) por lo que dicho mecanismo se sumaría al resto de vías celulares involucradas en el efecto protector de MLT contra el daño de la mucosa GI.

Los resultados de los estudios llevados a cabo muestran el papel de MLT en la prevención del daño tisular a nivel intestinal en el modelo *ex vivo* y a nivel gástrico en el estudio *in vivo*. A pesar de observar niveles más altos de COX-2 e iNOS en muestras tratadas con MLT junto con SD, también se observó la prevención del daño GI en dichas muestras, tal y como ha sido discutido, la prevención se debe principalmente al efecto antioxidante de MLT que mejora y contribuye a un estado redox favorable en los enterocitos. No queda claro el mecanismo que se encuentra detrás del aumento de ambas, en este sentido otros autores relacionan MLT con la inhibición de COX-2 e iNOS en diferentes células como los macrófagos murinos línea celular, RAW 264.7 (Deng y cols., 2006).

Por último, es importante destacar que los resultados de la permeación intestinal llevada a cabo utilizando el método *ex vivo* desarrollado en la fase 1, mostraron un ligero aumento en el valor de P_{app} del DS al permearse junto con la MLT, pero atendiendo a criterios de

correlación estadística, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$), por lo tanto, una administración conjunta de ambos fármacos no afectaría a la permeación intestinal del DS ni a los niveles plasmáticos de dicho fármaco.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de la presente tesis doctoral fueron las siguientes:

1. Se ha desarrollado una nueva técnica *ex vivo* para la predicción del valor de P_{app} basada en la permeación a través de duodeno de cerdo (*Sus scrofa*).
2. La técnica *ex vivo* tiene una correlación directa con los resultados obtenidos en cultivos celulares Caco-2 para fármacos de distinta clasificación biofarmacéutica que no presenten fenómenos de membrana intestinal como acumulación o metabolismo.
3. Se trata de una técnica que requiere menos recursos económicos, materiales, técnicos y tiempo, que otras técnicas *in vitro* para la determinación de P_{app} , como los cultivos celulares Caco-2.
4. La MLT ha demostrado un efecto preventivo de lesiones GI inducidas por el DS en un modelo *ex vivo* basado en duodeno de cerdo (*Sus scrofa*).
5. La MLT ha demostrado un efecto preventivo de lesiones GI inducidas por el DS cuando se administran ambos fármacos de forma concomitante durante un periodo de 7 días en un modelo *in vivo* con ratón (*Mus musculus*).
6. En presencia de MLT se produce un aumento de los niveles de COX-2 y se previene la formación de lesiones inducidas por DS, lo que es indicativo de una mejora del estado redox del enterocito por parte de la hormona pineal y de la formación de PGI₂ a partir de COX-2, responsable de la inhibición de la secreción de ácido gástrico y mejora del flujo sanguíneo de la mucosa.
7. En presencia de MLT se produce un aumento en los niveles de iNOs y se previene la formación de lesiones inducidas por el DS, lo que es indicativo de una mejora del estado redox del enterocito por parte de la hormona pineal que evitaría la interacción del NO con los ROS (O₂⁻), y en última instancia la producción del ONOO⁻. Al no interactuar con los ROS el NO sería responsable de la reparación de la mucosa al aumentar la angiogénesis y el flujo sanguíneo.

CAPÍTULO VI REFERENCIAS

A

Abdelaziz, H. K.; Saad, M.; Pothineni, N. V. K.; Megaly, M., Potluri; R., Saleh, M.; Mehta, J. L. Ácido acetilsalicílico para la prevención primaria de eventos cardiovasculares. *J. Ame. Coll. Cardio.* **2020**, *01(10)*, 76–90.

Aderem, A.; Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **2000**, *406*, 782–787.

Adeyeye, C.M.; Li, P.K. Diclofenac sodium. In *Analytical Profiles of Drug Substances*; Florey, K., Ed.; Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA, **1990**.

Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **2004**, *75*, 639–653.

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis J.; Ralf M.; Roberts K.; Walter P. *Introducción a la biología celular*. 3ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; **2011**.

Alfonso R. Gennaro. *Remington de Farmacia*. 20ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; **2003**.

Allaire, J. M.; Crowley, S. M.; Law, H. T.; Chang, S.; Ko, H.; Vallance, B. A. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* **2018**, *39(9)*, 677-696.

Alluri, H.; Wilson, R.L.; Shaji, C.A.; Wiggins, K. Melatonin preserves blood-brain barrier integrity and permeability via matrix metalloproteinase-9 inhibition. *PLoS ONE.* **2016**, *11*, e0154427.

Andrade, R.P.; Restrepo, R.M.; Vélez, A.H. *Patología: Fundamentos básicos de medicina*. Capítulo 6: Inflamación aguda y crónica. 3ª edición. Colombia: Corporación para investigaciones Biológicas CIB, **2016**.

Ansari, M.A.; Roberts, K.N.; Scheff, S.W. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 443–452.

Antolín, I.; Rodríguez, C.; Saínz, R. M.; Mayo, J. C.; Uría, H.; Kotler, M. L.; Rodríguez-Colunga, M. J.; Tolivia, D.; Menéndez-Peláez, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* **1996**, *10*(8), 882-90.

Asensio, C.; Levoín, N.; Guillaume, C.; Guerquin, M.J.; Rouguieg, K.; Chrétien, F.; Lopicque, F. Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dihydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: A key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs? *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 405–416.

Arriola, V.; Tischendorf, J.; Musuuza, J.; Barker, A.; Rozelle, J.W.; Safdar, N. Assessing the risk of hospital-acquired clostridium difficile infection with proton pump inhibitor use: a meta-analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2016**, *37*, 1408–1417.

Avelar R., D.; Peña V., R.; Toro M.E.M. *et al.* The Gut Microbiota: A Clinically Impactful Factor in Patient Health and Disease. *SN Compr. Clin. Med.* **2019**, *1*, 188–199.

Axelrod, J.; Weissbach, H. Enzymatic *O*-methylation of *N*-acetylserotonin to melatonin. *Science.* **1960**, *131*, 1312–1312.

B

Babatunji, E.O.; Abiola, F.A.; Abidemi, P.K. Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. *Pharmaceuticals.* **2015**, *8*, 151–175.

Baird, L.; Dinkova-Kostova, A.T. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 241–272.

Balasubramanian, V. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World J. Hepatol.* **2015**, *27*, 443–459.

Balimane, P.V.; Chong, S. Evaluation of permeability and P-glycoprotein interactions: Industry outlook. In *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, 1st ed. Springer Science Business Media, LLC: New York, NY, USA, **2008**.

Ballina, J.; Carmona, L.; Laffon, A. Impacto del consumo de AINE en la población general española. Resultados del estudio EPISER. *Rev. Esp. Reumatol.* **2002**, *29*(7), 337-42.

Barrios, J.M.; Lichtenberger, L.M. Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAIDs injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology.* **2000**, *118*, 1179–1186.

Basivireddy, J.; Vasudevan, A.; Jacob, M.; Balasubramanian, K.A. Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 339–349

Batista, A.P.; Da Silva, T.G.; Teixeira, A.A.; De Medeiros, P.L.; Teixeira, V.W.; Alves, L.C.; Dos Santos, F.A.; Silva, E.C. Ultrastructural aspects of melatonin cytotoxicity on Caco-2 cells *in vitro*. *Micron.* **2014**, *59*, 17–23.

Bernhard, W.; Postle, A.D.; Linck, M.; Sewing, K.F. Composition of phospholipid classes and phosphatidylcholine molecular species of gastric mucosa and mucus. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids.* **1995**, *1255*, 99–104.

Bidaut-russell, M., & Gabriel, S. E. Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterology.* **2001**, *15*(5), 739-53.

Bindu, S.; Pal, C.; Dey, S.; Goyal, M.; Alam, A.; Iqbal, M.S.; Bandyopadhyay, U. Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39387–39402.

Blobaum, A. L.; Marnett, L. J. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (7), 1425-41

Bu, P.; Ji, Y.; Narayanan, S.; Dalrymple, D.; Cheng, X.; Serajuddin, A.T. Assessment of cell viability and permeation enhancement in presence of lipid-based self-emulsifying drug delivery systems using Caco-2 cell model: Polysorbate 80 as the surfactant. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *99*, 350–360.

C

Cadenas, E.; Davies, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 222–230.

Caldwell, G. W.; Yan, Z. Optimization in Drug Discovery. *In vitro* methods. 2nd Edition. Springer Science + Business Media New York, **2014**.

Camilleri M.; Ford M. J. Colonic sensorimotor physiology in health. and its alteration in constipation and diarrhoeal disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1998**, *12*, 287–302.

Cao X.; Yu L. X.; Sun D. Drug absorption principles. In *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, 1st ed.; Krishna, R., Yu, L., Eds.; Springer Science Business Media, LLC: New York, NY, USA, **2008**.

Castellsague, J.; Riera-Guardia, N.; Calingaert, B. Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: a systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). *Drug Saf.* **2012**, *35*(12), 1127-1146.

Chai, G.; Xu, Y.; Chen, S.; Cheng, B.; Hu, F.; You, J.; Du, Y.Z.; Yuan, H. Transport mechanisms of solid lipid nanoparticles across Caco-2cell monolayers and their related cytotoxicology. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2016**, *8*, 5929–5940.

Cheungpasitporn, W.; Thongprayoon, C.; Kittanamongkolchai, W.; Srivali, N.; Edmonds, P. J.; Ungprasert, P.; O'Corragain, O. A.; Korpaisarn, S.; Erickson, S. B. Proton pump inhibitors linked to hypomagnesemia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ren. Fail.* **2015**, *37*, 1237–41.

Compare, D.; Pica, L.; Rocco, A.; De Giorgi, F.; Cuomo, R.; Sarnelli, G.; Romano, M.; Nardone, G. Effects of long-term PPI treatment on producing bowel symptoms and SIBO. *Eur. J. Clin. Invest.* **2011**, *41*(4), 380-6.

D

Dahlgren, D.; Roos, C.; Sjögren, E.; Lennernäs, H. Direct *in vivo* human intestinal permeability (Peff) determined with different clinical perfusion and intubation methods. *J. Pharma. Sci.*, **2015**, *104*, 2702- 2726.

D'Aiuto, F.; Nibali, L.; Parkar, M.; Patel, K.; Suvan, J.; Donos, N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 1241–1246.

Delves, P.; Martin, S.; Burton, D.; Roitt, I. Roitt Inmunología Fundamentos. 12ª Edición. Parte 1 Bases de la Inmunología. Capítulo 9: La producción de efectores. Editorial Médica Panamericana. **2014**.

Deng, W.; Tang, S.; Tseng, H.; Wu, K.K. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood*. **2006**, *108*, 518–524.

Díaz-Casasola, L. Gastric mucosa: Protective mechanisms and harmful effects of acetylsalicylic acid. Physiological and biochemical approaches. *Medicina e Investigación*. **2015**, *3(1)*, 100–103.

Dies, H.; Cheung, B.; Tang, J.; Rheinstädter, M.C. The organization of melatonin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 1032–1040.

Doluisio J.T., Billups H.F., Dittert L.W., Sugita E.T., Swintosky J.V. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 1196-1200.

Doménech J., Martínez J. y Plá, J.M. Biofarmacia y Farmacocinética, Volumen II: Biofarmacia, 2ª edición, Madrid: Editorial Síntesis, S.A.; **2001**.

Doménech J, Martínez J, Peraire C. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Primera ed. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.; **2013**.

Dou, T.; Wang, J.; Han, C.; Shao, X.; Zhang, J.; Lu, W. Cellular uptake and transport characteristics of chitosan modified nanoparticles in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 791–799.

Drazen, D. L.; Nelson, R.J.: Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology*. **2001**, *74*, 178–184.

Dubocovich, M.L.; Markowska, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, **2005**, *27(2)*, 101-110.

Duggan, K. C., Walters, M. J., Musee, J., Harp, J. M., Kiefer, J. R., Oates, J. A., Marnett, L. J. Molecular Basis for Cyclooxygenase Inhibition by the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Naproxen. *J. Bio. Chem*, **2010**, 285, 45, 34950–34959.

Dürk, T., Panther, E., Müller, T., Sorichter, S., Ferrari, D., Pizzirani, C., Di Virgilio, F.; Myrtek D., Norgauer, J. and Idzko, M. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Intl. Immunol*, **2005**, 17(5), 599–606.

E

Eitaro Aihara. Kristen A. Engevik. and Marshall H. Montrose. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, 10(79), 357–380.

EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use. ICH M9 Guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers, EMA/CHMP/ICH/493213/2018, **2020**.

F

Fainboim, L., Geffner, J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Capítulo 2. Inmunidad innata. Editorial Médica Panamericana. **2011**.

Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer*. **2007**, 121, 2381–2386.

FDA/CDER, Guidance for Industry. Waiver of *in vivo* bioavailability studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Tech. rep., Center for Drug Evaluation and Research, **2000**.

FDA/CDER, Guidance for Industry. Waiver of *in vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), **2017**.

Fitzpatrick, F.A. Cyclooxygenase enzymes: Regulation and function. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10, 577–588.

Fleisher D. Gastrointestinal transport of peptides. Peptide-based drug design, A.C.S. books, American Chemical Society, Washington D.C. **1995**.

Fornai, M.; Natale, G.; Colucci, R.; Tuccori, M.; Carazzina, G.; Antonioli, L.; Del Tacca, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Arch Pharmacol*, **2005**, *372*, 79–87.

Fornai, M.; Colucci, R.; Antonioli, L.; Awwad, O.; Ugolini, C.; Tuccori, M.; Blandizzi, C. Effects of esomeprazole on healing of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers in the presence of a continued NSAID treatment: Characterization of molecular mechanisms. *Pharmacol Res*, **2011**, *63*, 59–67.

G

García-Maurino, S.; Pozo, D.; Calvo, J. R.; Guerrero, J. M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* **2000**, *29*, 129–137.

García-Rayado, G.; Navarro, M.; Lanás, A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs, *Expert Rev Clin Pharmacol*. **2018**, *11(10)*, 1031-1043.

Gelberg H.B. Comparative anatomy. physiology. and mechanisms of disease production of the esophagus. stomach. and small intestine. *Toxicol Pathol*, **2014**, *42(1)*, 54–66.

Gillette, M. U.; McArthur, A.J. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behavioural Brain Res*, **1996**, *73*, 135-139.

Golpich, M.; Amini, E.; Hemmati, F.; Ibrahim, N.M.; Rahmani, B.; Mohamed, Z.; Raymond, A.A.; Dargahi, L.; Ghasemi, R.; Ahmadiani, A. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* **2008**, *97*, 16–26.

González A. I.; Cabrera M. A. P.; Del Val Bermejo, S. M. Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos. Umh Editorial electrónica. Elche, Universidad Miguel Hernández, **2015**.

H

Halliwell, B. Reactive Oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, **1991**, *91*, 14–22.

Hardeland, R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **2008**, *65(13)*, 2001-18

Hartman, K.G.; Bortner, J.D.; Falk, G.W.; Yu, J.; Martín, M.G.; Rustgi, A.K.; Lynch, J.P. Modeling inflammation and oxidative stress in gastrointestinal disease development using novel organotypic culture systems. *Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 1–5.

Hawa, N.S.; Kamisah, Y.; Kamsiah, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vasc Pharmacol*, **2015**, *71*, 40-56.

Hess, M.W.; Hoenderop, J. G.; Bindels, R.J.; Drenth, J. P. Systematic review: hypomagnesaemia induced by proton pump inhibition. *Aliment Pharmacol Ther* **2012**, *36*, 405–13.

Hussain, S.; Siddiqui, A.N.; Habib, A. *et al.* Proton pump inhibitors' use and risk of hip fracture: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int.* **2018**, *38*, 1999–2014

Hussain, S., Singh, A., Habib, A., & Kalam, A. Proton pump inhibitors use and risk of chronic kidney disease: Evidence-based meta-analysis of observational studies. *Clin Epid Glob Health*, **2019**, *7(1)*, 46-52.

I

Imhann, F.; Bonder, M.J.2, Vich-Vila, A.; Fu J.; Mujagic, Z.; Vork L.; Tigchelaar, E.F.; Jankipersadsing, S.A.; Cenit, M.C.; Harmsen, H.J.; Dijkstra, G.; Franke, L.; Xavier, R. J.; Jonkers, D.; Wijmenga C.; Weersma R.K.; Zhernakova A. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*. **2016**, *65(5)*, 740-8.

J

Jackson, L.M.; Wu, K.; Mahida, Y.R.; Jenkins, D.; Donnelly, M.T.; Hawkey, L.C.J. Cox-1 expression in human gastric mucosa infected with helicobacter pylori: Constitutive or induced? *Gut* **2000**, *47*, 762–770.

Johns, J. Estimation of melatonin blood brain barrier permeability. *J. Bioanaly. Biomed.* **2011**, *3*, 64–69.

K

Khattab, M.M. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol. Res.* **2001**, *43*, 463–467.

Kararli T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy. physiology. and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos*, **1995**, *16*(5), 351–380.

Kargman, S.; Charleson, S.; Cartwright, M.; Frank, J.; Riendeau, D.; Mancini, J.; O'Neill, G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* **1996**, *111*, 445–454.

Karrasch, T.; Steinbrecher, K.A.; Allard, B.; Baldwin, A.S.; Jobin, C. Wound-induced p38MAPK-dependent histone H3 phosphorylation correlates with increased COX- 2 expression in enterocytes. *J. Cell Physiol.* **2006**, *207*, 809–815.

Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Umeda, M.; Takeuchi, K. Protective effect of lafutidine against indomethacin-induced intestinal ulceration in rats: Relation to capsaicin-sensitive sensory neurons. *Digestion* **2000**, *61*, 39–46.

Kato, S.; Kitamura, M.; Korolkiewicz, R.P.; Takeuchi, K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*(5), 839–846.

Kearney, P.M.; Baigent, C.; Godwin, J. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ*, **2006**, *332*, 1302–1308.

Kelley, E.E.; Khoo, N.K.H.H.; Hundley, N.J.; Malik, U.Z.; Freeman, B.A.; Tarpey, M.M. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 493–498.

Keyse, S.M.; Tyrrell, R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *PNAS* **2006**, *86*, 99–103.

Kieboom, B.C.; Kiefte-de Jong, J.C.; Eijgelsheim, M. Franco, O. H.; Kuipers, E. J.; Hofman, A et al. Proton pump inhibitors and hypomagnesemia in the general population: a population-based cohort study. *Am J Kidney Dis* **2015**, *66*, 775–782.

Kim, H.J.; So, H.S.; Lee, J.H.; Lee, J.H.; Park, C.; Park, S.Y.; Park, R. Heme oxygenase-1 attenuates the cisplatin-induced apoptosis of auditory cells via down-regulation of reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1810–1819.

Kim S.K.; Cho C.D.; Wojtowycz A.R. The ligament of treitz (the suspensory ligament of the duodenum): anatomic and radiographic correlation. *Abdom Imaging*, **2008**, *33*(4), 395–397.

Kjellev, S. The trefoil factor family – small peptides with multiple functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1350–1369.

Klein, D.C.; Moore, R.Y. Pineal *N*-acetyltransferase and hydroxyindole-*O*-methyltransferase: Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **1979**, *174*, 245–262.

Kobayashi, O.; Miwa, H.; Watanabe, S.; Tsujii, M.; Dubois, R.N.; Sato, N.; Dubois, R.N. Cyclooxygenase-2 downregulates inducible nitric oxide synthase in rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *281*, 688–696.

Konaka, A.; Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Korolkiewicz, R.; Takeuchi, K. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol. Res.* **1999**, *40*, 517–524.

Kwok, C.S.; Arthur, A.K.; Anibueze, C.I.; Singh, S.; Cavallazzi, R. Loke, Y. K. Risk of *Clostridium difficile* Infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. *Am J Gastroenterology* **2012**, *107*, 1011–1019.

L

Lanas, A. NSAIDs and Aspirin Recent Advances and Implications for Clinical Management. 1st Ed. Part I Pharmacology and Mechanisms. Chapter 2 Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects of Anti-inflammatory Drugs. Springer International Publishing, **2016**.

Langenbach, R.; Morham, S.G.; Tiano, H.F.; Loftin, C.D.; Ghanayem, B.I.; Chulada, P.C.; Smithies, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* **1995**, *83*, 483–492.

Langenbach, R.; Loftin, C.; Lee, C.; Tiano, H. Cyclooxygenase knockout mice. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *58*, 1237–1246.

Laszlo, F.; Whittle, B.J.R. Role of nitric oxide and platelet-activating factor in the initiation of indomethacin-provoked intestinal inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *344*, 191–195.

Lee, M.; Kallal, S.M.; Feldman, M. Omeprazole prevents indomethacin-induced gastric ulcers in rabbits. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1996**, *10*, 571–576.

Lee, K.M.; Kang, B.S.; Lee, H.L.; Son, S.J.; Hwang, S.H.; Kim, D.S.; Park, J.S.; Cho, H.J. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 3375–3381.

Lee, P.P.N.; Shiu, S.Y.W.; Chow, P.H.; Pang, S.F. regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duck gastro-intestinal tract. *Neurosignals* **1995**, *4*, 212–224.

Leon, J.; Acuña-Castroviejo, D.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Tan, D.X.; Reiter R.J. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* **2004**, *75(7)*, 765-90.

Lerner, A.B.; Case, J.D.; Takahashi, Y. Isolation of melatonin and 5- methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1992–1997

Leung, P. S. The Gastrointestinal System. Faculty of Medicine. The Chinese University School of Biomedical Sciences. Hong Kong China. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, **2014**.

Li, Y.; Soendergaard, C.; Bergenheim, F.H.; Arono, D.M.; Milne, G.; Riis, L.B.; Nielsen, O.H. COX-2–PGE 2 signaling impairs intestinal epithelial regeneration and associates with TNF inhibitor responsiveness in ulcerative colitis. *E. Bio. Medicine* **2018**, *36*, 497–507.

Lichtenberger, L.M.; Wang, Z.M.; Romero, J.J.; Ulloa, C.; Perez, J.C.; Giraud, M.N.; Barreto, J.C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: Insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 154–158

Lichtenberger, L.M.; Zhou, Y.; Jayaraman, V.; Doyen, J.R.; O’Neil, R.G.; Dial, E.J.; Volk, D.E.; Gorenstein, D.G.; Boggara, M.B.; Krishnamoorti, R. Insight into NSAID-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: Characterization of interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids.* **2012**, *1821*, 994–1002.

Lombardo, L.; Foti, M.; Ruggia, O; et al. Increased incidence of small intestinal bacterial overgrowth during proton pump inhibitor therapy. *Clin. Gastroent. and Hepatol.* **2010**, *8*, 504–8.

Lorenzo, P.; Moreno, A.; Lizasoain, I.; Leza, J.; Moro, M. Portolés, A. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 19º Edición. Ed. Médica Panamericana, **2017**.

M

Macchi, M.M.; Bruce, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrinol.* **2004**, *25*, 177–195.

Macpherson, A.; Rafi, S.; Mahmood, T.; Hayllar, J.; Jacob, M.; Scott, D.; Wrigglesworth, J.M. Mitochondrial damage: A possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* **2010**, *41*, 344–353.

Maestroni, G.J.; Covacci, V. C. A. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer. Res.*, **1994**, *54*, 2429-2432.

Mahad, D.H.; Trapp, B.D.; Lassmann, H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 183–193.

- Maharaj, A.S.; D'Amore, P.A. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc. Res.* **2007**, *74*, 100–113.
- Mahmud, T.; Rafi, S.S.; Scott, D.L.; Wrigglesworth, J.M.; Bjarnason, I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Arthritis Rheum.* **1996**, *39*, 1998–2003.
- Main, I.H.M.; Whittle, B.J.R. The effects of E and A prostaglandins on gastric mucosal blood flow and acid secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1973**, *49*, 428–436.
- Majed, B.H.; Khalil, R.A. Molecular Mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 540–582.
- Markowska, M.; Oberle, R.; Juzwin, S.; Hsu, C.P.; Gryszkiewicz, M.; Streeter, A.J. Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. *J. Pharm. Toxicol. Methods.* **2001**, *46*, 51–55.
- Martínez, M.-ángel M. Evaluación económica de la restricción del uso de piroxicam en España. *Reumatol. Clin.* **2015**, *11*(6), 345–352.
- Masferrer, J.L.; Isakson, P.C.; Seibert, K. Cyclooxygenase-2 inhibitors: A new class of anti-inflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. *Gastroenterology. Clin. N. Am.* **1996**, *25*, 363–372.
- Mayo, J.C.; Aguado, A.; Cernuda-Cernuda, R.; Álvarez, A.; Cepas, V.; González, I.Q.; Rosa, M.S. Melatonin uptake by cells: An answer to its relationship with glucose? *Molecules* **2018**, *23*, 1999.
- McGettigan, P.; Henry, D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: A systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* **2006**, *296*, 1633–1644.
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, *1*, 135–145.
- Mc Cord, J. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 652–659.

McCarberg B.; Gibofsky A. Need to develop new nonsteroidal anti-inflammatory drug formulations. *Clin Ther.* **2012**, *34*(9),1954- 1963.

Mei, Q.; Diao, L.; Xu, J.; Liu, X.; Jin, J. A protective effect of melatonin on intestinal permeability is induced by diclofenac via regulation of mitochondrial function in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* **2011**, *32*, 495–502.

Moniczewski, A.; Gawlik, M.; Smaga, I.; Niedzielska, E.; Krzek, J.; Przegaliński, E.; Pera, J.; Filip, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 560–568.

Miazga, A.; Osin' ski, M.; Cichy, W.; Z' aba, R. Advances in medical sciences current views on the etiopathogenesis, clinical manifestation, diagnostics, treatment and correlation with other nosological entities of SIBO. *Adv. Med. Sci.* **2015**, *60*, 118–124.

Munford, M.L.; Pasa, A. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. *J. Pineal Res.* **2010**, *49*, 169–175.

N

Naik, E.; Dixit, V.M. Mitochondrial reactive oxygen species drive pro-inflammatory cytokine production. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 417–420.

Nathan, C. Specificity of a third kind: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signalling. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 769–778.

Nikitina, O.S.; Welcome, M.O. Pereverzev, V.A Human anatomy and physiology. In: 2 parts. Part 1. Belarusian State Medical University Press. Minsk, **2016**.

O

Ohnishi, S.; Ma, N.; Thanan, R.; Pinlaor, S.; Hammam, O.; Murata, M.; Kawanishi, S. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *387014*, 1–9.

ONU. UNITED NATIONS DEMOGRAPHIC YEARBOOK 2018. Department of Economic and Social Affairs, **2019**.

P

Macheras, P.; Iliadis, A. Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Homogeneous and Heterogeneous Approaches. Vol 30. Chapter 5 and 6. Springer Science + Business Media, Inc. Switzerland, **2006**.

Park, Y.J.; Yoo, S.A.; Kim, W.U. Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. *J. Korean Med. Sci.* **2014**, *29*, 2–11.

Pastorino, A.; Greppi, F.; Bergamo, D.; Versino, E.; Bo, M.; Pezzilli, M. S. et al. Proton pump inhibitors and hypomagnesemia in polymorbid elderly adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2015**, *63*, 179–80.

Pearson, S.P.; Kelberman, I. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *Postgrad. Med.* **1996**, *100*, 131–143.

Petruzzelli, M.; Vacca, M.; Moschetta, A.; Cinzia Sasso, R.; Palasciano, G.; van Erpecum, K.J.; Portincasa, P. Intestinal mucosal damage caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Role of bile salts. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 503–510.

Piechota-Polanczyk, A.; Fichna, J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2014**, *387*, 605–620.

Pierrefiche G.; Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp. Gerontol.* **1995**, *30(3-4)*, 213-27.

Pickup, J.C. Inflammation and activate innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 813–823.

Poplawski, C.; Sosnowski, D.; Szaflarska-Popławska, A.; Sarosiek, J.; McCallum, R.; Bartuzi, Z. Role of bile acids, prostaglandins and COX inhibitors in chronic esophagitis in a mouse model. *World J. Gastroenterology.* **2006**, *12*, 1739–1742.

R

Randall. E. Harris. Inflammation in the pathogenesis of chronic diseases. The COX-2 controversy. *Subcellular Biochemistry.* Vol 42. Chapter 1. Pages 3-27. Dordrecht, Springer, **2007**.

Rainsford. K.D.; Path. M.R.C. Aspirin and the salicylates. Chapter 1: History and development of the salicylates. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., Published by Elsevier Ltd. **1984**.

Ratuapli, S. K.; Ellington, T. G.; O'Neill, M.T.; Umar, S.B.; Harris, L. A.; Foxx-Orenstein, A. E.; Burdick, G. E.; Dibaise, J. K.; Lacy, B. E.; Crowell, M. D. Proton pump inhibitor therapy use does not predispose to small intestinal bacterial overgrowth. *Am J Gastroenterology*. **2012**, *107*(5), 730-5.

Reiter R. J.; Tan D. X.; Mayo J. C.; Sainz R. M.; Leon J; Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50*(4), 1129-46.

Reiter, R. J.; Paredes, S. D.; Manchester, L. C.; Tan, D. X. Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly discovered genre for melatonin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44*, 175–200.

Reiter, R.J.; Fuentes-broto, L.; Paredes, S.D.; Tan, D.; Garcia, J.J. Melatonin and the pathophysiology of cellular membranes. *Marmara Pharm. J.* **2010**, *14*, 1–9.

Reiter, R.J. Pineal Melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **1991**, *12*, 151–180.

Res, P. Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J. Pineal Res.* **2003**, *34*, 288–293.

Res, P. Melatonin decreases duodenal epithelial paracellular permeability via a nicotinic receptor – dependent pathway in rats *in vivo*. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 282–291.

Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616.

Rhen, T.; Cidlowski, J.A. Anti-inflammatory Action of Glucocorticoids: New Mechanisms for Old Drugs. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1711-23.

Riccardi, C., Levi-schaffer, F.; Tiligada, E. Immunopharmacology and Inflammation. 1^a Edición. Switzerland. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature **2018**.

Robert, A.; Nezamis, J.E.; Lancaster, C.; Hanchar, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*. **1979**, *77*, 433–443.

Rodriguez-Stanley, S.; Redinger, N.; Miner, P.B. Effect of naproxen on gastric acid secretion and gastric pH. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *23*, 1719–1724.

Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V.; Reiter, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **2004**, *36(1)*, 1-9.

Roos, C. Intestinal absorption of drugs. The impact of regional permeability, nanoparticles, and absorption-modifying excipients. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 260. 73 pp. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. **2018**.

S

Sainz, R.M.; Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Roldan, F.; Natarajan, M.; Quiros, I.; Hevia, D.; Rodriguez, C.; Mayo, J.C. Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells *in vitro*. *J. Pineal Res.* **2008**, *45(3)*, 258-70.

Sánchez-Domínguez, B.; Bullón, P.; Román-Malo, L.; Marín-Aguilar, F.; Alcocer-Gómez, E.; Carrión, A.M.; Sánchez-Alcazar, J.A.; Cordero, M.D. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. *Mitochondrion*. **2015**, *21*, 69–75

Scheiman, J.M.; Hindley, C.E. Strategies to optimize treatment with NSAIDs in patients at risk for gastrointestinal and cardiovascular adverse events. *Clin. Ther.* **2010**, *32*, 667–677.

Shida, C.S.; Castrucci, A.M.; Lamy-Freund, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* **1994**, *16*, 198–201

Simoncini, C.; Orsucci, D.; Caldarazzo, E.; Siciliano, G.; Bonuccelli, U.; Mancuso, M. Alzheimer's pathogenesis and its link to the mitochondrion. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *803942*, 1–8.

Singer, I.I.; Kawka, D.W.; Schloemann, S.; Tessner, T.; Riehl, T.; Stenson, W.F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* **1998**, *115*, 297–306.

Smaga, I.; Niedzielska, E.; Gawlik, M.; Moniczewski, A.; Krzek, J.; Przegalin, E.; Pera, J.; Filip, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 569–580.

Söderquist, F.; Hellström, P.M.; Cunningham, J.L. Human gastroenteropancreatic expression of melatonin and its receptors MT1 and MT2. *PLoS ONE.* **2015**, *10*, e0120195.

Sommer, F.; Anderson, J. M.; Bharti, R.; Raes, J.; Rosenstiel, P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol.* **2017**, *15(10)*, 630–638.

Sugano K, Nabuchi Y., Machida M., Aso Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.* **2003**, *257*, 245-251.

T

Talevi, A.; Quiroga, P.; Ruíz, E.M. Procesos biofarmacéuticos: su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia. 1ª edición. Editorial de la Universidad de La Plata. **2016**.

Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Terron, M.P.; Flores, L.J.; Reiter, R.J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* **2007**, *42*, 28–42.

Tessaro, F.H.; Ayala, T.S.; Martins, J. O. Lipid mediators are critical in resolving inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 568408.

Theoharides, T. C., Alysandratos, K., Angelidou, A., Delivanis, D., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S.; Vasiadi, M.; Weng, Z.; Miniati, A. and Kalogeromitros, D. Mast cells and inflammation. *Biochim. et Biophys. Acta.* **2012**, 1822, 21–33.

Tortora, G. J.; Derrickson, B. Principios de anatomía y fisiología. Capítulo 22: Inmunidad innata. 11ª Edición. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana. **2010**.

Tran, H.T.; Tran, P.H.; Lee, B. New findings on melatonin absorption and alterations by pharmaceutical excipients using the Ussing chamber technique with mounted rat gastrointestinal segments. *Int. J. Pharm.* **2009**, 378, 9–16.

Tucker, P.; Scanlan, A.; Dalbo, V.J. Chronic kidney disease influences multiple systems: Describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 806358, 1–8.

U

Urata Y.; Honma S.; Goto S.; Todoroki S.; Iida T.; Cho S.; Honma K.; Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27(7-8), 838-47.

W

Watanabe, T.; Higuchi, K.; Kobata, A.; Nishio, H.; Tanigawa, T.; Shiba, M.; Arakawa, T. Intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut.* **2008**, 57, 181–187.

Welcome. M.O. *Gastrointestinal Physiology*. 1ª Edición.; pp 53–219. Switzerland. Springer: Basel. **2018**.

Whittle, B.; Boughton-Smith, N.K.; Moncada, S.; Vane, J.R. Actions of prostacyclin (PGI₂) and its product 6-oxo-PGF₁ on the rat gastric mucosa *in vivo* and *in vitro*. *Prostaglandins.* **1978**, 15, 955–967

Wilson, D.E.; Phillips, C.; Levine, R.A. Inhibition of gastric secretion in man by prostaglandin A₁. *Gastroenterology.* **1971**, 61, 201–206.

Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging Dis.* **2018**, 19(1), 143-150.

Wu, C.C.; Lu, K.C.; Lin, G.J.; Hsieh, H.Y.; Chu, P.; Lin, S.H.; Sytwu, H.K. Melatonin enhances endogenous heme oxygenase-1 and represses immune responses to ameliorate experimental murine membranous nephropathy. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 460–469

X

Xia, Y.; Liu, L.; Zhong, C.; Geng, J. NF- κ B activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 851–856.

Xie, W.L.; Chipman, J.G.; Robertson, D.L.; Erikson, R.L.; Simmons, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *PNAS.* **1991**, *88*, 2692–2696.

Xue-Qing, C.; Stefanski, K.; Shen, H.; Huang, C.; Caporuscio, C.; Yang, W.; Lam, P.; Su, C.; Gudmundsson, O.; Hageman, M. Oral delivery of highly lipophilic poorly water-soluble drugs: spray-dried dispersions to improve oral absorption and enable high-dose toxicology studies of a P2Y1 antagonist. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *12*, 3924–3931.

Y

Yadav, U.; Ramana, K.V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *690545*, 1–11.

Yamashita, S.; Furubayashi, T.; Kataoka, M.; Sakane, T.; Sezaki, H.; Tokuda, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 195–204.

Yang, Y.X.; Metz, D. C. Safety of proton pump inhibitor exposure. *Gastroenterology.* **2010**, *139(4)*, 1115-27.

Z

Zhang, H., Chang, Y., Zheng, Q. *et al.* Altered intestinal microbiota associated with colorectal cancer. *Front. Med.* **2019**, *13*, 461–470.

Zhou, B., Huang, Y., Li, H. *et al.* Proton-pump inhibitors and risk of fractures: an update meta-analysis. *Osteoporos. Int.* **2016**, *27*, 339–347.

OTROS MÉRITOS

7. Artículo 4 (Revisión bibliográfica)

Antioxidant Nanoplatforms for Dermal Delivery: Melatonin.

*(Nanoplataformas antioxidantes para liberación dérmica:
melatonina)*

Autores: Aroha B. Sánchez, Ana C. Calpena y Beatriz Clares.

Current Drug metabolism; 2017;18(5):437-453.

Índice de impacto: 2.559 (ISI Journal Citations Reports)

Categoría: **Bioquímica Clínica (Q2)**
 Farmacología (Q2)

REVIEW ARTICLE

Antioxidant Nanoplatfoms for Dermal Delivery: Melatonin

Aroha Sánchez Milán^a, Ana Cristina Calpena Campmany^a and Beatriz Clares Naveros^{b*}^aDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^bDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

Abstract: Background: Melatonin is emerging as a promising therapeutic agent, mainly due to its role as antioxidant. Substantial evidences show that melatonin is potentially effective in a variety of diseases as cancer, inflammation and neurodegenerative diseases. The excellent antioxidant capacity with pharmacokinetics characteristics and the emerging search for new pharmaceutical nanotechnology based systems, make it particularly attractive to elaborate nanoplatfoms based on melatonin for biomedical or cosmetic dermal applications. Different nanosystems for dermal delivery have been investigated.

Objective: This review focuses on nanocarrier production strategies, dermal melatonin application and delivery advances *in vivo* and *in vitro*. Equally, future perspectives of this assisted melatonin delivery have also been discussed.

Method: In the current review, we have revised relevant articles of the available literature using the major scientific databases.

Results: One hundred and thirteen papers were included in the review, the majority of which represent latest researches in nanosized platfoms for the dermal delivery of melatonin including liposomes, ethosomes, niosomes, polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles and cyclodextrins. Furthermore, relevant papers reporting *in vitro* and *in vivo* application studies of these nano-based melatonin platfoms were also discussed.

Conclusion: The use of nanoplatfoms for the dermal melatonin delivery as antioxidant agent could improve the efficacy of conventional melatonin administration due to the preservation of the drug from premature oxidation and the enhancement of drug permeation through the skin providing greater exposure times.

ARTICLE HISTORY

Received: August 08, 2016

Revised: December 08, 2016

Accepted: January 17, 2017

DOI:

10.2174/1389200218666170222145908

Keywords: Antioxidants, melatonin, dermal delivery, nanosystems, pharmacokinetics, skin metabolism.

INTRODUCTION: ANTIOXIDANTS DELIVERY NANO-SYSTEMS ACROSS THE SKIN

Skin is the largest organ in the human body and one of the most susceptible for oxidant agents attack, both endogenous and exogenous. Skin has its own antioxidant protective systems, such as DNA repair enzymes, oxidative prevention mechanisms, physical defences and antioxidant substances (enzymes or scavengers) [1]. Multiple targets are susceptible of producing oxidative damage to the skin. All of these are related to the pathophysiology of different diseases [2]. One of the main exogenous oxidant agents is UV radiation ($\lambda=320-380$ nm of visual spectrum) which induces damage in proteins, lipids [3] and DNA, among other structures. This damage occurs through well-known mechanisms and could lead to cancer, inflammatory and immune diseases [4]. The relation between oxidative stress and skin aging is accepted and has also been well-documented [5].

According to the World Health Organization, the incidence of skin cancer rates, including rates of melanoma cancers, has increased in the past few years. Annually, between 2 to 3 million non-melanoma skin cancers and 132,000 melanoma skin cancers are diagnosed. Recreational sun exposure and history of severe sunburn should be assumed as the major causes [6]. This increased incidence of skin cancer occurs due to the confluence of two major factors. Firstly, sun recreational exposure augments due to social reasons. More people now have greater access to sunny destinations

and tanned skin is now a predominant trend. In addition, there is now a high increment in UV radiation. Concretely, in Europe, it has been estimated to increase about 5-10% from 1980s till now [7].

The data lead us to think about the great interest and impact of dermal application of antioxidant molecules. A small study which measured epidermal thickness, stratum corneum moisture, elasticity and wrinkle volume as measurable parameters showed that antioxidants dermally applied resulted in an improvement of epidermal thickness, elasticity and skin moisture, while oral administration only improved the epidermal thickness. The combined approach of oral and dermal application resulted in a significant improvement of all investigated skin parameters [8].

However, classical systems like emulsions or suspensions are not useful because, dermally applied, antioxidant molecules are quickly degraded. It would be helpful to include these molecules into systems that protect them from oxidation.

Nanotechnology has a great impact on the development of new drug delivery systems or nano-platfoms. Through the use of these nano-platfoms, we can obtain different advantages such as the option to modify delivery profiles of the associated drug [9, 10], modify body distribution through different targeting strategies [11-13], increase its bioavailability [14], increase the therapeutic efficacy [15], improve stability [16-19], use non-conventional administration routes [20, 21], increase the absorption of certain drugs through different mucous membranes [22, 23], *etc.*

Regarding dermal delivery, nanoparticles allow obtaining an enhanced local action, reaching certain layers of the stratum corneum or to enhance systemic bioavailability through different transport routes across stratum corneum [24]. Moreover, different

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Granada University, P.O. Box: 18071 (Campus of Cartuja St. s/n), Granada, Spain; Tel/Fax: +34-958-246-664, +34-958-248-958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

release kinetic profiles as Higuchi model [25], zero-order kinetics [26] might be obtained in order to provide constant, prolonged and sustained plasma levels of the desired active substance.

There have been studies which focused on the specific case of antioxidant substances, for example, tocopherol dermally applied in a nanoemulsion led to a significant increase in the bioavailability when compared with a microemulsion system [27]. Another study compared the coenzyme Q10 (Q10) permeation profile across the skin loaded in a gel by simple solution and loaded in solid lipid nanoparticles (SLNs). Results showed a penetration 2.6 times higher in SLNs than in the simple solution gel, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively [28].

The use of nanoparticles is especially interesting for hydrophilic drugs because the efficacy of drugs with high polarity index may be limited due to their low intracellular absorption and low permeability across the skin [29].

In a previous paper, we reviewed the role of melatonin (MLT) as a powerful antioxidant [30]. Its role has been corroborated by numerous *in vitro* studies and clinical trials. The results of these clinical trials revealed substantial evidences regarding MLT as being potentially effective in a variety of diseases as cancer, inflammatory and neurodegenerative diseases, making MLT a promising therapeutic agent.

For all these reasons, this article is aimed to review all dermal delivery nanosystems loading MLT in which MLT is used as antioxidant agent; we also discuss its main physicochemical and pharmacokinetics properties, advantages and benefits of this use compared with classical MLT delivery systems. It should be noted that this review has never been done before.

MAIN MELATONIN PHARMACOKINETIC ASPECTS (ADME)

The chemical structure of MLT has two amphiphilic groups and its lipophilic nature allows good absorption properties through different mucous membranes [31]. The pineal hormone shows a linear pharmacokinetic behaviour [32]. We can consider that MLT possesses low oral bioavailability since it shows variable oral absorption, short biological half-life and extensive first pass metabolism [33-35].

Recently, a review has been conducted regarding MLT pharmacokinetics parameters after oral and intravenous (IV) administration [36], main results included low oral bioavailability, around 14-16%, in a dose range of 2-4 mg and linear pharmacokinetics behaviour. Orally administrated, different studies showed a t_{max} from 23 to 90 min, although majority of studies reported a value of approximately 60 min. Cl/F mean for all reviewed studies was 5.78 L/min, CV (%) 50%. Concerning the IV route, mean clearance value for all studies included in the review was 3.9 L/min, CV=80%, indicative of the great inter-individual variability for this primary parameter. $T_{1/2}$ IV was 36 and 41 min for men and women, respectively.

A recent review on alternative routes for MLT administration [37] showed that intranasal administration of MLT in humans resulted in a high bioavailability, up to 94%, compared to oral administration. In this review, the transdermal absorption rate was slow and evidences of an accumulative mechanism of MLT in the skin were found. An experiment carried out with hairless Sprague-Dawley rats [38] evidenced that this skin retention and the pharmacokinetic parameters of MLT, transdermally administered, changed according to the time of the day. The data adjustment to a non-compartmental pharmacokinetic model resulted in a K_s value significantly higher at activity phase than at rest phase. Furthermore, t_{max} at activity phase occurred earlier than at rest phase, and finally, the half-life of K_s was longer at activity phase (paired t-test, $p < 0.05$ in all comparisons). These authors also found that $\text{AUC}_{0-\infty}$ showed higher values during the rest phase ($p < 0.05$).

MLT binds to human serum albumin (HSA) mainly by hydrogen bonds and van der Waals forces, 1 MLT molecule to 1 HSA molecule [39]. This fact must be taken into account in case of diseases with HSA low blood levels such as hepatic, renal or gastrointestinal diseases, because parameters as V_d and $t_{1/2}$ could be modified.

Regarding the metabolism of MLT, main hepatic metabolite of MLT is 6-hydroxymelatonin [40]. The urinary levels of this metabolite are used to assess pineal gland production of MLT in humans [41]. In the skin, MLT metabolism involves the indolic and kynuric pathways. Indolic pathway is the main route of MLT metabolism in keratinocytes, melanocytes and fibroblasts. Indolic pathway produces 6-hydroxymelatonin as the main product and 5-methoxytryptamine as the minor one [42]. However, through kynuric pathway, MLT is mostly metabolized to 2-hydroxymelatonin and N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK). These metabolites are also produced through the direct non-enzymatic action of ultraviolet B (UVB) radiation. UVB also induces additional metabolism of AFMK to N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) by the action of the arylamine formamidase [43]. The MLT excretion is undertaken predominantly renally [41].

Pharmacokinetics characteristics of MLT, including low oral bioavailability, oxidation sensitivity and skin metabolism lead us to think about the need and suitability of design of new delivery systems and new strategies for dermal administration of this promising drug.

MELATONIN DERMAL APPLICATION: CLASSICAL DELIVERY SYSTEMS AND POTENTIAL APPLICATION

Before addressing this section, we need to discuss about MLT skin receptors (MT1 and MT2), whose regulation and activation mechanisms have been extensively reviewed. MT1 (high affinity receptor) is a G protein-coupled membrane receptor [44] which inhibits the adenylate cyclase action, and thus causes the inhibition of the cAMP response element binding protein/activation transcription factor. Through this pathway, MLT modulates antioxidant gene transcription. MT1 activation also modulates phospholipase C/protein kinase (PLC/PKC), mitogen-activated protein kinases (MAPK), and extracellular-signal-regulated kinase (ERK1/2) pathways. These pathways are involved in apoptosis regulation, among others. Conversely, MT2 (low affinity receptor) activation leads to phosphoinositide production, inhibition of adenylyl cyclase and inhibition of soluble guanylyl cyclase. MT2 receptors are located in keratinocytes. This receptor is suggested to be involved in MLT antiproliferative effect in human melanoma cell line SK-Mel 28, among other protective effects.

If the dermal application of MLT formulated in a cream was compared with an ethanolic solution of MLT, skin accumulation of MLT could be observed for at least 8 h before being absorbed in the second case. While in the case of the MLT cream, absorption through the skin would begin instantaneously and continuously. However, in the case of a more concentrated MLT ethanolic solution, the absorption would commence in just one h [45]. Therefore, dermal absorption may depend on the formulation type and MLT concentration in such preparation or vehicle, as an example of this different behaviour or a function of the vehicle, Flo *et al.* [46] have evaluated the influence of different vehicles on the permeation of MLT through buccal and skin tissues.

Concerning the pharmacological effect, MLT leads to a significant and dose-dependent suppression of UV-induced erythema if administered before UV exposure [47]. This effect increases when MLT is administered in combination with other antioxidants molecules, such as vitamin C (ascorbic acid) or vitamin E (α -tocopherol) [48]. A more recent study has gone beyond demonstrating that MLT-based pickering emulsion presented a powerful protection against UVB-induced damage in HaCat cells including inhibition of

apoptosis. The inclusion of zinc oxide, titanium dioxide, green coffee oil and starch ensured a high sunscreen protection factor (50+) against UVA and UVB [49]. These HatCat cells are a spontaneously immortalized human keratinocyte line [50].

Another field of MLT topical application is the reduction of radiation side effects, particularly acute dermatitis, which is the most common of these effects. This therapeutical approach is mostly used in breast, lung, and head and neck tumours. Classical therapy is based on topical application of sucralfate, hyaluronic acid or corticosteroids [51], although the use of these anti-inflammatory molecules generated some controversy [52]. Topical application of MLT results in a decrease of acute dermatitis caused by radiotherapy [53]. In this same line of investigation, the beneficial influence of MLT evaluation in topical sunscreen emulsions combined with three common ultraviolet filters resulted in the prevention of undesirable adverse effects after skin UV exposure [54].

MLT dermal application is therefore an interesting tool as protective agent against radiation, for example derived from sun exposure or from radiotherapy treatment. So, we could say that we are dealing with a possible field of clinical application.

NANOPLATFORMS FOR MELATONIN DERMAL DELIVERY: OBTAINING METHODS AND CHARACTERIZATION

Up to this point, everything reviewed leads us to think about the need to design new delivery systems and new strategies for dermal administration of this promising drug. Firstly, there are potential pharmacological applications and, on the other hand, recent developed nanosystems present technological advantages over conventional systems that provide higher plasma levels of MLT and stronger local or systemic pharmacological potential effect.

There are studies dealing with different classes of nanoplatfoms for MLT or MLT agonist vehiculization. The most common nanoplatfoms are liposomes (LPs), solid lipid nanoparticles (SLNs), ethosomes and polymeric nanoparticles (NPs).

In following sections, we review the most important MLT nanosystems, elaboration methods and characterization results.

Liposomes

LPs are artificial and nanometric sized self-close vesicles, whose principal components are phospholipids. Phospholipids are arranged in concentric bilayers, inside which there is an aqueous compartment [55]. Given the nature of their composition, they can carry both hydrophilic and hydrophobic drugs [56]. Hydrophilic drugs are located inside the micelles with hydrophobic anchored to phospholipid bilayers. Moreover, they demonstrate absence of cytotoxicity even at high doses, because LPs have an excellent biocompatibility [57]. Another advantage is their versatility, since they can be easily modified by adding different components to the membrane, such as polymers [58-60], peptides [61], or lipids [62], and by changing the charge and properties thereof. Several formulations of MLT loaded LPs have been developed.

Table 1 summarizes the main characteristics and elaboration methods of MLT or MLT agonist loaded LPs. Quinteros, *et al.* [63] developed four LPs formulations composed of 1,2-propylene glycol (PG), phosphatidylcholine (PC), cholesterol (Chl), α -tocopherol (vitE) and the drug encapsulated (a MLT agonist, 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (5-MCA-NAT)). Then, LPs were dispersed in four different solutions, first in sodium chloride (NaCl), second in sodium hyaluronate (SH), third in sodium carboxymethylcellulose (CMC), and finally, in two types of poloxamers (PX), PX407 and PX188 (12/8 w/w). The achieved encapsulation was 7.9 ± 3.0 %. Elaboration method is schematized in Fig. (1).

Other authors developed MLT loaded LPs composed of PC and deoxycholate (DSC) 14-86%, respectively [64-66]. They achieved

encapsulation efficiency eight times and half higher than that obtained by Quinteros, *et al.* [63]. Due to the lipophilicity of MLT, higher phosphatidylcholine concentration resulted in better encapsulation efficiency.

Methods for obtaining LPs are shown in Table 1. Different studies have reported four principal steps in common: lipid mixture, solvent evaporation, rehydration and extrusion. The conditioning factors to be considered are the ratio and type of lipid. The best encapsulation efficiency was for LPs obtained with phosphatidylcholine and sodium deoxycholate.

As we can observe in the Figs. (1-4), there are only slight differences between the MLT loaded LPs obtaining methods, such as the moment of MLT addition or the kind of lipid. Quinteros, *et al.* [63] opted for the hydration of lipids with a solution containing MLT, while the rest of authors chose to start with an alcoholic solution of drug in which lipids were dissolved.

Ethosomes

Derived from LPs, ethosomes are lipid vesicular systems which incorporate ethanol in relative high concentrations. The use of these nanocarriers in skin delivery is an interesting option because classic LPs do not penetrate into deeper layers of skin. As a rule, LPs stand in the upper layer of stratum corneum [67]. However, using a skin penetration enhancer as ethanol, a deeper penetration level of active compounds can be achieved [68]. Based on this information, some authors have developed MLT loaded ethanolic LPs or ethosomes [69]. These ethosomes showed a low polydispersity index (0.032 ± 0.011), a good percentage of entrapment efficiency (70.71 ± 1.4 %) and compared with classic LPs, the nanometric size range was 122 ± 3.5 nm. The method of production is diagrammed in Fig. (5). It is a very simple obtaining method, in which the conditioning factors to consider are rate of incorporation of distilled water, stirring rate and temperature for this process (30 °C).

Niosomes

Niosomes are lamellar vesicles prepared with non-ionic surfactants such as sorbitan fatty acid esters (Span® series), polysorbates (Tween® series), and polyethoxy fatty ethers (Brij® series). Compared with phospholipid-based vesicles, niosomes have low cost of production, higher chemical stability and greater membrane flexibility [70]. Among other properties, niosomes may improve transdermal permeation [71, 72], achieving enhanced therapeutic effect [73, 74] and/or modified drug delivery profiles [75]. For these reasons MLT is a good candidate for inclusion in niosomes. Priprem, *et al.* [76] developed MLT loaded niosomes of Span® 60, cholesterol, dimethyl sulfoxide/sodium deoxycholate (SDC) and MLT in proportion 1:1:1:5. The size selection was performed by extrusion using a polycarbonate membrane with pore size of 100 nm. Main characteristics of the obtained niosomes were average particle diameter of 86 ± 3 nm and zeta potential of -54.4 ± 0.6 mV. This negatively charged surface prevented particle aggregation and provided high stability. Furthermore, an encapsulation efficiency of 95 ± 0.1 % was achieved.

Solid lipid nanoparticles

SLNs are an alternative of LPs. The name suggests that SLNs are nanospheres formed (at 25 °C) by a solid matrix of physiological lipids stabilized by an appropriate surfactant [77]. Both lipid and surfactant type have influence on the physicochemical properties and biocompatibility of SLNs. For example, by using short chain fatty acids, smaller SLNs can be obtained [78]. Furthermore, the use of lipids with higher melting point leads to larger SLNs average size. Similar results were obtained when high lipid concentration was utilized [79]. Regarding the kind of surfactant, Pradhan *et al.* [80] showed that higher concentration thereof, resulted in smaller particle size and smaller polydispersity (up to 1% w/v of stabilizer). The encapsulation efficiency of this nanosized delivery system is

Table 1. Summary of different obtaining methods of MLT or MLT agonist loaded LPs and main characteristics.

Composition	Lipid Class	Obtaining Method	Encapsulation Efficiency (%)	Size (nm)	Others	Reference
100 µM 5-MCA-NAT 0.275% PG, 10 mg/mL PC, and 0.788% NaCl	PC, Cht, VitE (8:1:0.08)	Lipid mixture in CHCl ₃ , organic solvent evaporation, hydration with a drug solution and finally diluting of liposome solution obtained with NaCl and PG aqueous solutions.	7.9±3.0	155.1	Zeta potential (mV) 10.2±2.7	[63]
100 µM 5-MCA-NAT 0.275% PG, 10 mg/mL PC, 0.788% NaCl and 0.2% SH	PC, Cht, VitE (8:1:0.08)	Lipid mixture in CHCl ₃ , organic solvent evaporation, hydration with a drug solution and finally diluting of liposome solution obtained with NaCl, PG and SH aqueous solutions.	7.9±3.0	162.8	Zeta potential (mV) 8.7±2.7	[63]
100 µM 5-MCA-NAT 0.275% PG, 10 mg/mL PC, 0.788% NaCl and 0.5% CMC	PC, Cht, VitE (8:1:0.08)	Lipid mixture in CHCl ₃ , organic solvent evaporation, hydration with a drug solution and finally diluting of liposome solution obtained with NaCl, PG and CMC aqueous solutions.	7.9±3.0	188.5	Zeta potential (mV) 7.2±4.5	[63]
100 µM 5-MCA-NAT 0.275% PG, 10 mg/mL PC, 0.479% NaCl and PX	PC, Cht, VitE (8:1:0.08)	Lipid mixture in CHCl ₃ , organic solvent evaporation, hydration with a drug solution and finally diluting of liposome solution obtained with NaCl, PG and PX407 aqueous solutions.	7.9±3.0	181.8	Zeta potential (mV) 6.4±0.9	[63]
20 µM / 50 µM or 100 µM of MLT, 250 µM PC	PC	Dissolution of PC in CHCl ₃ and methanolic solution of melatonin, organic solvent evaporation, rehydration and extrusion on polycarbonate membranes to obtain LUV.	-	100 ± 10	-	[64]
MLT 0.1 to 2.0 % v/v, PC and SDC.	PC, SDC 86%-14 % (v/v)	Lipid mixture, organic solvent evaporation, hydration with 0.2 M PTB (pH 6.5) by rotation (60 rpm, 1 h), manual extrusion through 200 and 100 nm polycarbonate membrane filters.	67.1 ± 2.2% (with 1 % v/v of MLT)	118±10	Polydispersity index 0.08	[65]
MLT 3, 6, 9, 15, 24 and 30 mol % and DPPG	DPPG	Dissolution of MLT in ethanol, solvent evaporation, DPPG and chloroform addition, organic solvent evaporation and then pumping it for 2 h under vacuum. A dried lipid film obtained was hydrated by adding 25 µL of 10 mM PTB. LPs were formed by vortexing the mixture.	-	-	-	[66]

Notes: PC, Phosphatidylcholine; Cht, cholesterol; VitE, α -tocopherol. NaCl, sodium chloride; PG, 1,2-propylene glycol; SH, sodium hyaluronate; CMC, sodium carboxymethylcellulose; PX, poloxamer (PX407 and PX188 12/8 w/w); 5-MCA-NAT, 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine; DPPG, dipalmitoyl phosphatidylglycerol; CHCl₃, chloroform; LUV, large unilamellar vesicles; MLT, melatonin; SDC, sodium deoxycholate; PTB, phosphate buffer; DPPG, dipalmitoyl phosphatidylglycerol.

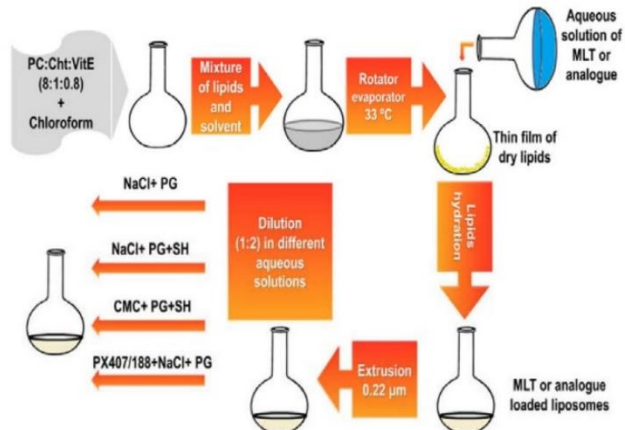


Fig. (1). Obtaining process diagram of PC (phosphatidylcholine) Cht, (cholesterol) and VitE (α -tocopherol) LPS according to Quinteros *et al.* [63].

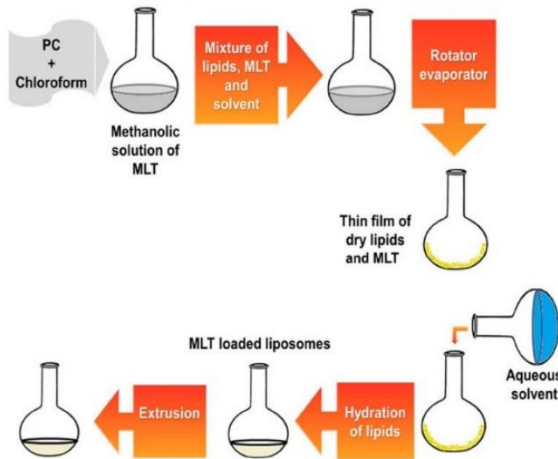


Fig. (2). Obtaining process diagram of PC (Phosphatidylcholine) LPS according to Marchetti *et al.* [64].

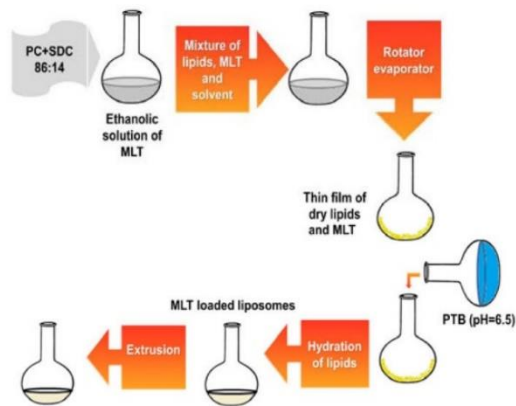


Fig. (3). Obtaining process diagram of PC (Phosphatidylcholine) and SDC (sodium deoxycholate) LPS according to Dubei *et al.* [65].

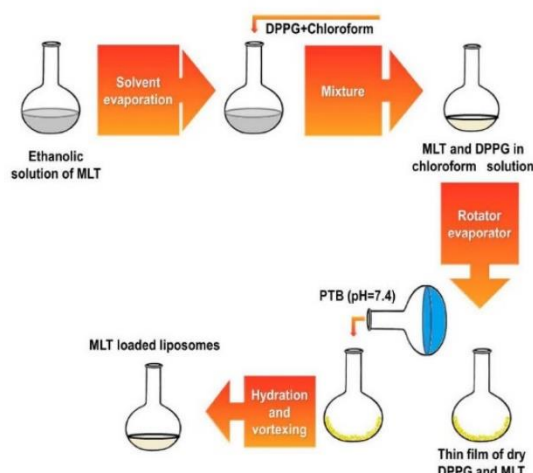


Fig. (4). Obtaining process diagram of DPPG (dipalmitoyl phosphatidylglycerol) LPs according to Ipek *et al.* [66].

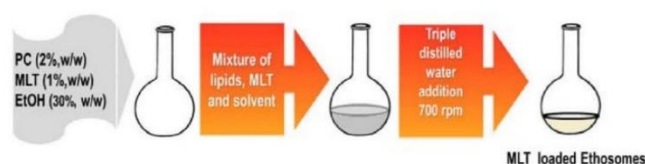


Fig. (5). Obtaining process diagram of PC (Phosphatidylcholine) ethosomes according to Dubei *et al.* [69].

strongly influenced by solubility of the active substance in the solid lipid matrix, so close that they are directly proportional [81].

Leonardi, *et al.* [82] developed a battery of these kinds of formulations using different types and percentages of lipids. As a result, they obtained MLT loaded-SLNs with different sizes, polydispersity indexes and/or percentages of encapsulation efficiency. Concretely, they used different combinations of didecylmethylammonium bromide (DDAB) and palmitic acid (PA) or stearic acid (SA). The obtaining method is represented in Fig. (6). We can conclude that the key step of this process is the addition of the MLT solution and the lipid mixture over the surfactant, which must be performed gradually injecting the first solution through a thin Teflon tube under high stirring speed (13,500 rpm).

Polymeric Nanoparticles

Polymeric NPs are composed of natural or synthetic polymers, which may be biodegradable or not. The main natural polymers used are gelatine [83], chitosan [84], alginate [85], cellulose and derivatives thereof [86]. Among synthetic polymers used are poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [87], poly-(cianoacrylate) (PCA) [88] and polycaprolactone [89]. Nanosystems obtained from mixtures of polymer and lipid have also been reported, the main examples are lecithin and chitosan NPs [90]. Both, natural and synthetic NPs present some advantages and disadvantages. On one hand, natural polymers do not show toxicity but show poor homogeneity and impurities problems. On the other hand, synthetic NPs obtaining methods are more reproducible [91, 92].

The nature polymeric NPs as drug delivery systems are quite diverse, as diverse as the purposes to be achieved, such as con-

trolled release [87], targeting and therapeutic action improvement [88], decreasing side effects and enhancing the drug cellular uptake [89], increasing drug permeation [90] and bioavailability improvement of poor water soluble compounds [93].

Anita, *et al.* [94] reported lecithin/chitosan (L/C) MLT loaded NPs with good properties of mucoadhesion in order to provide nasal administration of MLT. Fig. (7) shows the three steps of the elaboration method. These authors developed L/C MLT loaded NPs with different types of lecithins (S45, S75 and S100) and different L/C weight ratios (5:1, 10:1 and 20:1). Other published papers with the same preparation method obtained similar results under identical conditions [95-97]. Table 2 includes main characteristics and shows that the best entrapment efficiency was achieved by S45 lipid, 5:1 and 10:1 L/C ratios. This study also shows that size and surface charge of the NPs prepared depended on both, lecithin type and the lecithin/chitosan weight rate.

PLGA and PLGA-PEG MLT loaded nanocarriers have been developed by Giovanni, *et al.* [98]. They used the solvent displacement method with Tween® 80 (0.5%, w/v) as surfactant. NPs purification was performed by ultracentrifugation. Centrifugation conditions were different for these types of NPs, $\times 15,000$ g, 1 h at 5 °C for PLGA NPs, and $\times 4000$ g, 4 h at room temperature for PLGA-PEG NPs. In order to complete purification, centrifugation was replicated three times in each case. The obtaining method is schematized in Fig. (8). They reported that both types of NPs were spherical and homogeneous with smooth surfaces. PLGA-PEG MLT loaded NPs exhibited higher entrapment efficiency (%), smaller size and greater polydispersity index than PLGA MLT loaded NPs.

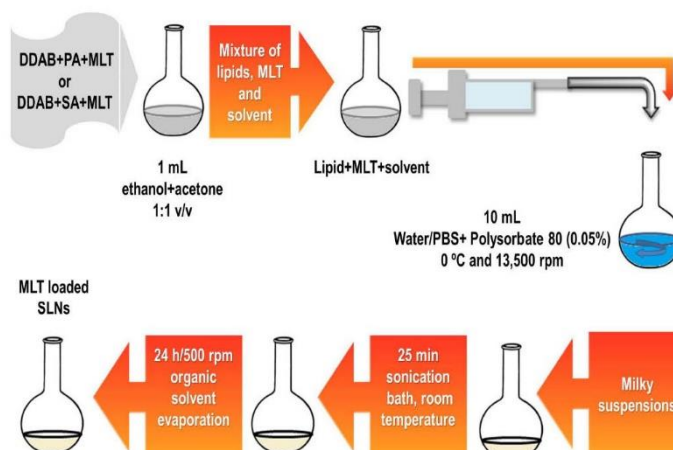


Fig. (6). Obtaining process diagram of MLT (melatonin), DDAB (didecyltrimethylammonium bromide), PA (palmitic acid) and SA (stearic acid) SLNs according to Leonardi *et al.* [82].

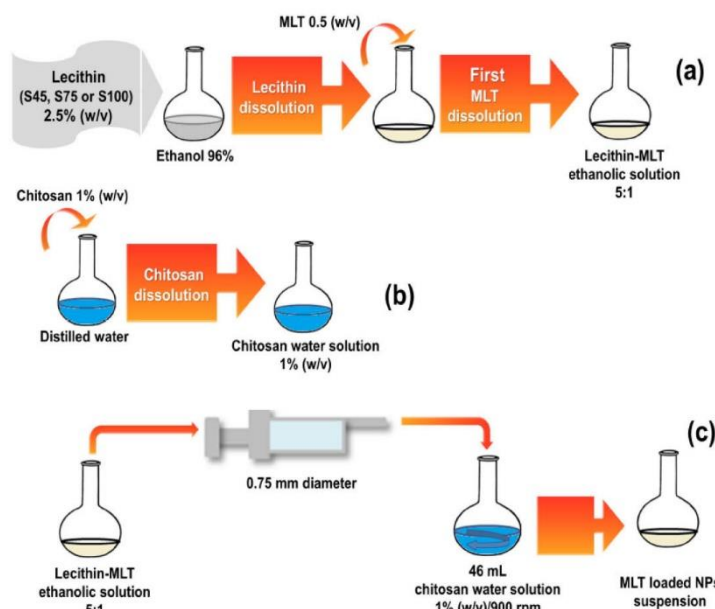


Fig. (7). (a) Obtaining of ethanolic solution of lecithin-to-melatonin (5:1) (b) Obtaining of chitosan water solution (1% w/v) (c) Obtaining of MLT loaded NPs suspension by injection of 4 mL of the first ethanolic solution in to 46 mL of chitosan water solution under constant stirring according to Hafner, *et al.* [94].

Musumesci, *et al.* also obtained PLGA and PLGA-PEG NPs using the solvent displacement method [99] showed in Fig. (8). In Table 2, the composition and entrapment efficiency values of these NPs are displayed. It can be observed that as they obtained identical entrapment efficiency values, Giovanni *et al.* [98] used the same drug/polymer ratio and the same elaboration method based on a previous work of Musumesci, *et al.* [100]. These results suggest

that the method presents good reproducibility and suitability for preparing NPs at laboratory scale.

MLT-loaded nanocapsules and nanospheres, using anionic copolymers based on methacrylic acid and methyl methacrylate have been prepared too [101]. The obtaining method was the same in both cases, and it was based on the interfacial polymer deposition following solvent displacement [102]. Nanocapsules are a vesicular

Table 2. Summary of different obtaining methods of MLT loaded polymeric NPs and main characteristics.

Composition		Entrapment efficiency (%)	Mean Size (nm)	Obtaining method	Reference
S100 Lecithin/chitosan	L/C 5:1	5.2	125.6 ± 0.6	Injection through syringe inner diameter of 0.75mm under constant stirring of 900 rpm (Fig. 7)	[94]
	L/C 10:1	5	121.6 ± 2.8		
	L/C 20:1	4.9	143.3 ± 3.3		
S75 Lecithin/chitosan	L/C 5:1	5.3	239.7 ± 5.3	Injection through syringe inner diameter of 0.75mm under constant stirring of 900 rpm (Fig. 7)	[94]
	L/C 10:1	5.3	158.4 ± 10.1		
	L/C 20:1	5	243.5 ± 5.9		
S45 Lecithin/chitosan	L/C 5:1	7.1	347.5 ± 3.2	Injection through syringe inner diameter of 0.75mm under constant stirring of 900 rpm (Fig. 7)	[94]
	L/C 10:1	7.1	329.1 ± 10.5		
	L/C 20:1	6.4	246.2 ± 8.1		
PLGA 1% w/w (MLT/polymer) + Tween® 80 at 0.5 w/v		44.15 ± 4.7	122.50 ± 14.3	Solvent displacement method (Fig. 8)	[98]
PLGA-PEG 1% w/w (MLT/polymer) + Tween® 80 at 0.5 w/v		78.20 ± 3.4	83.8 ± 1.10	Solvent displacement method (Fig. 8)	[98]
Resomer® RG 502 H (PLGA)	1 % w/w (MLT/polymer)	44.15 ± 3.51	-	Solvent displacement method (Fig. 8)	[99]
	3 % w/w (MLT/polymer)	12.28 ± 7.52	-		
	5 % w/w (MLT/polymer)	5.77 ± 2.83	-		
Resomer® RGP d 50105 (PLGA- PEG)	1 % w/w (MLT/polymer)	78.20 ± 2.93	-		
	3 % w/w (MLT/polymer)	45.30 ± 4.1	-		
	5 % w/w (MLT/polymer)	25.18 ± 2.73	-		
Triglycerides + Eudragit® S100 + Span® 80 nanocapsules (0.5 mg/mL of MLT)		55.77	236 ± 20	Interfacial polymer deposition following solvent displacement	[101]
Eudragit® S100 + Span® 80 nanospheres (0.5 mg/mL of MLT)		54.35	126 ± 12	Interfacial polymer deposition following solvent displacement	[101]
PCL + MCTG + SM + PS80 lipid-core nanocapsules (MLT 0.125 mg/mL)		32.11 ± 0.05	199 ± 18.6	Self-assembling mechanism	[103]

Notes: MLT, melatonin; S45, fat-free soybean lecithin with 45% phosphatidyl choline; S75, fat-free soybean lecithin with 70% phosphatidyl choline; S100, phosphatidyl choline from fat-free soybean lecithin; L/C, lecithin/chitosan ratio; Resomer® RG 502 H (PLGA), poly-D,L-lactide-co-glycolide 50:50, free carboxyl endgroup; Resomer® RGP d 50105 (PLGA-PEG), polyethylene glycol-co-(poly-D,L-lactide-co-glycolide) 48:52 to 52:48 mole %, PEG portion 8–12%; PCL, poly-ε-caprolactone; MCTG, medium chain triglycerides; SM, sorbitan monoesterate; PS80, polysorbate 80.

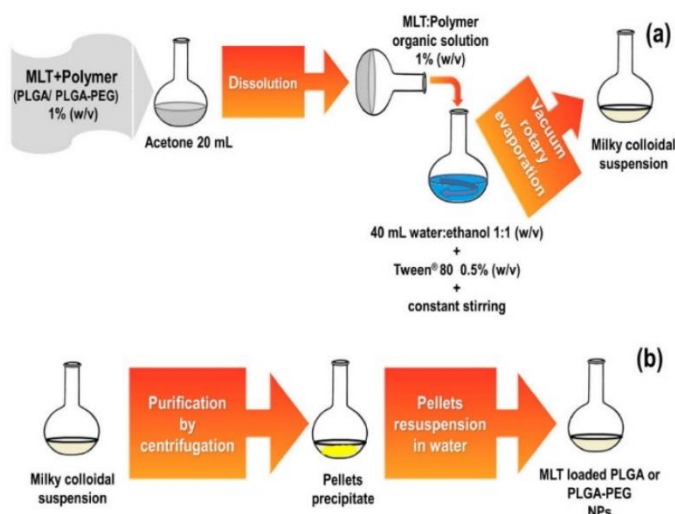


Fig. (8). (a) Obtaining of milky colloidal suspension as first step of solvent displacement method for PLGA and PLGA-PEG NPs development. (b) Purification step consisting of centrifugation and resuspension of precipitate in water according to Giovanni, *et al.* [98, 99].

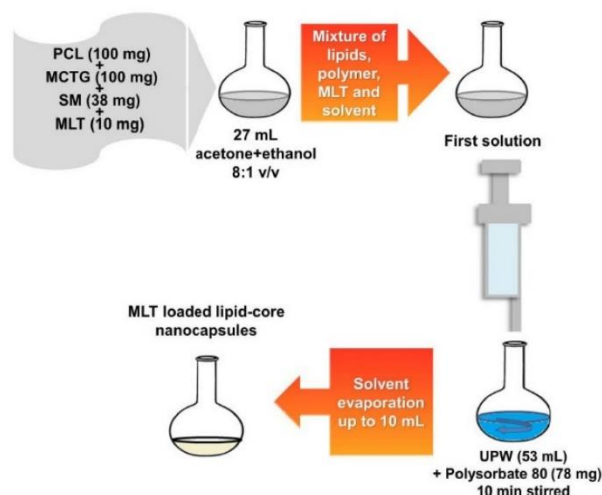


Fig. (9). Obtaining method of MLT-loaded lipid-core nanocapsules composed of PCL (Poly-ε-caprolactone), MCTG (medium chain triglycerides), SM (sorbitan monoestearate), MLT (melatonin), UPW (ultra-purified water) and Polysorbate 80. Notes: Fv, final volume [103].

system with a lipid core surrounded by a polymeric shell. Nanospheres consist of a matrix of polymers, so the main chemical difference between both obtained nanosystems composition was the triglycerides presence. Table 2 shows some characteristics of these developed nanosystems.

Charao, *et al.* [103] incorporated 10 mg MLT in an organic solution in the first step of the self-assembling mechanism method proposed by Jomada, *et al.* [104] in order to obtain another MLT-loaded lipid-core nanocapsule type. This obtaining method is schematized in Fig. (9).

Cyclodextrins Complexes

There are also studies reporting MLT delivery systems based on cyclodextrins (CDs) inclusion complexes. CDs are cyclic (α-1,4)-linked oligosaccharides of α-D-glucopyranose containing a relatively hydrophobic central cavity and hydrophilic outer surface [105]. The incorporation of CDs into polymeric drug delivery systems is intended to change the drug-polymer interaction and thus modify the mechanism of drug release [106]. Based on these principles, some authors have developed inclusion complexes of CDs with MLT where drug solubility was related with CDs concentra-

tion, thus the 1:1 h-g stoichiometry in water solution prevails at low CDs concentrations. The trend to form higher order associations is observed at increasing CDs concentrations. Moreover, they studied the stability of different MLT-CDs complexes in water and the obtained results were in order of decreasing stability: β -CD > γ -CD > α -CD [107].

Other authors developed hydrogel networks using MLT-CDs complexes as pendant groups [108]. They synthesized a monovinyl β -CD monomer, then they prepared β -CD hydrogels by the copolymerization of glycidyl methacrylate-ethylenediamine- β -CD (GMA-EDA- β -CD) and 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) in aqueous solution at 20 °C using ammonium persulfate/sodium bisulphite redox system as initiator. Finally, the MLT loading into the hydrogel at 0.9% was performed in water/methanol mixture (75/25, w/w) at 25 °C for 48 h, and subsequently, the free MLT remaining on the surface was removed by washing. Results of hydrogels release will be discussed in the *in vitro* section below.

IN VITRO AND EX VIVO STUDIES

A review about the main development methods of MLT loaded NPs found in literature has been conducted. This section will discuss the *in vitro* and *ex vivo* studies addressed with some of them. Table 3 summarizes the main *in vitro* and *ex vivo* studies accomplished with different MLT loaded nanocarriers.

The four LPs formulations obtained by Quinteros, *et al.* [63] were also subjected to an *in vitro* release study in which the MLT analogue released from the different formulations was studied using a dialysis method. These authors used phosphate buffered solution as receptor medium. Results showed that the 5-MCA-NAT release rate from LPs dispersed in SH and CMC was lower than conventional LPs (dispersed in NaCl), and lower than 5-MCA-NAT in simple solution. They found statistically significant differences. A low release rate could improve therapeutic effect or could induce tissue accumulation.

Dubei, *et al.* [65] addressed an *ex vivo* permeation study through human skin, using Franz diffusion cells with 10 mL of PBS (pH 6.5) as receptor medium, constantly stirred for 24 h at 37 ± 1 °C. They tested elastic LPs as nanocarriers for transdermal delivery and demonstrated an enhanced permeation of MLT into the deeper layers of the skin, enhanced transdermal flux, a decrease of lag time and an optimum permeability coefficient. They concluded that the obtained MLT transdermal bioavailability from LPs was better when compared with a simple MLT solution.

Other work that aimed to enhance the transdermal delivery of MLT was also carried out by Dubei, *et al.* [69], by the preparation of ethosomes nanocarriers (modified LPs through ethanol addition). They also carried out an *ex vivo* permeation study through human skin, using Franz diffusion cells and the same receptor medium (PBS, pH 6.5). They also performed an *in vitro* release study by dialysis technique under sink conditions, and finally, they conducted an *in vivo* skin irritancy study, which will be discussed in the following section. Conditions of the experiment were the same as in the previous case. They used human cadaveric skin as permeation membrane, with an effective permeation area of 1 cm² and 10 mL of phosphate buffer solution (PBS) as receiver cell volume. The experiment was performed for 24 h, at 32 ± 1 °C under constant stirring at 100 rpm. The release rate through dialysis membrane was almost four times higher for ethosomes than for LPs. Results of ethosomes permeation study exhibited an increased transdermal flux and percentage MLT skin deposition, and a decreased lag time compared with common LPs and a hydroethanolic solution of MLT.

Leonardi, *et al.* [82] developed a battery of cationic SLNs made of didecyltrimethylammonium bromide (DDAB), palmitic acid (PA) and stearic acid (SA). Developed SLNs were then subjected to *in vitro* release study using the common dialysis method. The con-

clusion of their findings was that the presence of PA or SA in the formulation reduced the amount of drug released.

Hafner, *et al.* [94] developed MLT loaded L/C NPs to obtain nasal delivery systems with the required mucoadhesion properties. These NPs released about 60-70% of MLT in 4 h. The permeability of MLT in NPs L/C 20:1 prepared with Lipoid S45 lecithin was significantly enhanced when compared with a simple MLT solution ($p < 0.001$) and from all other NPs investigated ($p < 0.05$). This study also demonstrated that the mucoadhesion did not induce plasma membrane damage in the concentration tested. In other study, the same authors investigated the release profile, the MLT permeability through corneal epithelium and mucoadhesive properties of L/C NPs [97].

Giovanni, *et al.* [98] conducted a release study and tested the antioxidant potential of PLGA and PLGA-PEG polymeric MLT loaded NPs. The obtained results were satisfactory, since NPs proved to be significantly effective in oxidative stress inhibition in a sepsis rat model. This conclusion came after measuring several oxidative stress markers as lipid hydroperoxide (LOOH) and total thiol groups (RSH). LOOH levels were increased in positive control group of sepsis and significantly decreased with the PLGA and PLGA-PEG NPs administration. RSH levels were also decreased in positive control group of sepsis and significantly increased with the administration of NPs. All results were better for MLT loaded NPs than those for MLT simple solution. There were also evidences on enhancing antioxidant effect of MLT on lipid peroxidation when the drug was entrapped in nanocapsules and nanospheres [101]. In other *in vitro* experiment, several MLT concentrations and two different substrates for lipid peroxidation were assayed (LPs and microsomes). The results showed that the presence of MLT significantly decreased the lipid peroxidation. Best results were achieved by these authors when they used 400 μ M MLT-loaded nanocapsules versus a negative control and 200 μ M MLT-loaded nanocapsules. They reported lipid peroxidation inhibition rate of $51 \pm 6.5\%$ using LPs as substrate.

Other interesting study showed a therapeutic effect of MLT as DNA protector when the drug was administered shaped as MLT-loaded lipid-core nanocapsules when compared with a MLT simple solution ($p < 0.05$) in a lung cell toxicity model induced by paraquat [74]. This indicated that the therapeutic effect of MLT as antioxidant would increase by designing a formulation based on nanotechnology.

PLGA and PLGA-PEG NPs developed by Musumeci, *et al.* [99] showed lower lag time than those reported by Giovanni, *et al.* [98]. Concerning MLT release profiles from PLGA and PLGA-PEG NPs, the authors suggested that hydrophilic PEG chains on the surface increased the release process allowing a faster leakage of the entrapped drug.

Results for hydrogels MLT-loaded-CDs studies showed that the release rate of MLT from hydrogel increased with the decrease of β -CD content. Moreover, a sustained release of MLT was achieved from those hydrogels in which β -CD was included [108].

IN VIVO STUDIES

Table 4 provides an overview of *in vivo* studies carried out with some MLT loaded nanocarriers. MLT agonist loaded LPs obtained by Quinteros *et al.* [63] were used for *in vivo* studies. They made an *in vivo* study of the therapeutic efficacy as ocular hypotensive agent in rabbits by measuring the percentage of inhibition of intraocular pressure (IOP). They observed that the maximum hypotensive effect was achieved by LPs dispersed in SH (39% of IOP reduction) closely followed by LPs dispersed in CMC (36% of IOP reduction). Using these two formulations, they carried out *in vivo* tear osmolality measurements and observed that when animals were treated with LPs combined with two bioadhesive polymers, the tear osmolality diminished signifi-

cantly at any time in comparison to basal value. Finally, they conducted an *in vivo* tolerance study whose results were fully favourable, without discomfort or irritation signs. A comparative pharmacokinetic behaviour study between compressed MLT tablets and MLT loaded LPs spray, which was sublingually administered showed 50% higher AUC for LPs with onset time. It was remarkably faster for the sublingual spray that showed increased MLT levels immediately and a peak plasma level at 2 h, which was sustained for 6 h, whereas tablet dosage formed peak 4 h after administration and the elimination phase began shortly thereafter [109]. This behaviour indicated better bioavailability. Keller and Fisher, in a US patent [110], reported a method for producing liposomal MLT spray composed by purified lecithin, cholesterol, tocopherol acetate, pyridoxine hydrochloride, glycerine, ethyl alcohol, sodium benzoate, polysorbate 20, purified water, MLT and other excipients such as flavour, citric acid and sweetener.

Leonardi, *et al.* [82] carried out the same *in vivo* studies of therapeutic efficacy by measuring inhibition of IOP and the ocular tolerability assessment using a battery of MLT loaded SLNs. Ocular tolerability results were also positive for these nanocarriers. Regarding the therapeutic efficacy as ocular hypotensive agent, the batch of formulations that showed higher IOP reduction was composed of 0.1% (w/v) DDAB, 0.1% (w/v) PA, 0.05% (w/v) MLT and 0.05% (w/v) Tween® 80. The mean size of this batch was 222.9 ± 1 nm and showed low polydispersity index, zeta potential of +59.70 ± 0.52 mV and drug encapsulation efficiency of 95.89% and 451.1 µg/mL of MLT.

An interesting *in vivo* study demonstrated that MLT-loaded SLNs orally administered resulted in a delayed release with 20 min difference of t_{max} when compared with a MLT simple solution, while mean AUC and mean half-life of elimination were significantly higher. This work also showed that MLT absorption and elimination after MLT-loaded SLNs transdermal administration were slower. Authors obtained MLT plasma levels above 50 pg/mL, which were maintained for at least 24 h [111].

Another *in vivo* study testing the efficacy of MLT loaded NPs was performed by Musumeci, *et al.* [99]. In this study, the hypotensive effect of two different polymeric nanoparticles was evaluated and compared with each other, as well as, a simple solution of MLT. Mucoadhesion properties allowed an increased contact time between NPs and the rabbit eye surface. A decreased IOP was obtained for both NPs, but the effect was greater for PLGA-PEG, probably due to lower zeta potential of PLGA-PEG NPs that might allow a better and longer interaction between the nanocarrier and the eye, since the cornea and conjunctiva have a net negative charge.

A study tested the intranasal delivery of MLT from MLT loaded niosomes. Results showed that intranasal MLT administration involved the drug distribution in the liver, hypothalamus and testis, which indicated systemic absorption by this route. Moreover, a daily dose of 20 mg/kg/day for 90 days did not show histological changes in nasal mucosa when compared with its control [76]. All these findings suggested that niosomes were an optimal tool for MLT administration.

Schaffazick, *et al.* [112] carried out an *in vivo* experiment in which MLT (1 or 10 mg/kg) associated with polysorbate 80-coated nanocapsules was administered intraperitoneally in 6 mice, using a MLT aqueous solution as control. Subsequently, the frontal cortex, hippocampus and liver of animals were examined. Malondialdehyde was used as lipid peroxidation marker and results showed significant lipid peroxidation inhibition ($p < 0.05$) in the frontal cortex of mice treated with MLT-loaded nanocapsules for both doses (1 and 10 mg/kg). Hippocampus and liver showed significant lipid peroxidation inhibition ($p < 0.05$) in mice when treated with the 10 mg/kg nanocapsules.

DISCUSSION AND CLINICAL PHARMACOKINETIC IMPLICATIONS

We have already reviewed the properties, elaboration, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies of different MLT nanosystems. Considering the obtained results, the nanoplatforams that showed better efficiency of entrapment were elastic LPs, nanocapsules and PLGA-PEG NPs. Equally, we have already discussed that the obtaining methods of PLGA-PEG NPs seem to have a good reproducibility, as well as, they are more stable than LPs. On the other hand, those LPs made of phospholipid have lower inherent toxicity or more biocompatibility than NPs based on synthetic polymers.

Elastic LPs are the vesicles with more potential for the improvement of the skin penetration rate and rigid LPs would be useful in those cases requiring a delayed release. These differences could be attributed to the varied types of interactions between cells and LPs according to their composition. Elastic LPs contain a high percentage of PC and surfactants have been reported to promote the process of fusion with cell membranes [113], so MLT skin flux penetration can be enhanced using LPs rich in surfactants, as they allow a faster fusion between dermal cells and LPs.

After analyzing all the information contained in the researched literature, the highlights in terms of MLT nanosystems biopharmaceutics and pharmacokinetics reported to date are:

- 5-MCA-NAT LPs leads to slow release compared with a simple solution in an *in vitro* experiment.
- Elastic MLT loaded elastic LPs have higher release rate than rigid LPs.
- Transdermal flux across human skin is higher for elastic LPs than regular LPs and higher when compared with a plain MLT solution.
- Elastic LPs show a lower lag time than MLT simple solution.
- SLNs formulated with PA or SA reduce the amount of released drug.
- Lecithin/Chitosan Polymeric NPs enhance MLT permeability and decrease MLT release rate.
- PLGA MLT NPs show zero order release profile, with a lag time up to 24 h.
- Nanospheres lead to an enhancement of antioxidant properties of MLT against lipid peroxidation when compared with a MLT simple solution.
- CDs-based MLT formulations lead to a sustained release.
- MLT SLNs maintained MLT plasma levels for 24 h.

The use of MLT nanoplatforams as a new strategy for drug delivery may improve the efficacy of conventional MLT administration. We have evidenced numerous studies where the antioxidant or therapeutic activity of MLT was enhanced. It may be due to the protection of MLT molecule from premature oxidation, better penetration across skin and/or greater exposure times to the drug compared with simple solutions.

In view of the foregoing, topical application of referred nanosystems would improve the potential use of MLT in practice. For example, as sun protection formulation, the administration of MLT in an optimal nanosystem would reach higher levels and longer residence times in skin layers compared with classical formulations. Likewise, the use of MLT to alleviate side effects derived from radiotherapy or as anti-aging formulation could be enhanced by its inclusion in the appropriate nanosystem. On other occasions, the use of these transdermal delivery nanosystems might provide optimal plasmatic levels to obtain consistent systemic effects. Thus, the dermal route could offer the possibility of either local or systemic effect through the selection of a particular type of MLT delivery nanosystem.

Table 3. Summary of *in vitro* and *ex vivo* studies carried out with different MLT loaded nanocarriers.

Nanoplateform	Type of Study	Results	References
5-MCA-NAT LPs (0.275% PG, 10 mg/mL PC, and 0.788% NaCl)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions. Medium: Phosphate buffered solution isotonicized with NaCl (pH 7.4)	Release rate was statistically significant lower ($p < 0.05$) than simple solution of drug after 1 h	[63]
5-MCA-NAT LPs (0.275% PG, 10 mg/mL PC, 0.788% NaCl and 0.2% SH)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions. Medium: Phosphate buffered solution isotonicized with NaCl (pH 7.4)	Non-significant differences ($p > 0.25$ in all cases) between SH and NaCl dispersed LPs	[63]
5-MCA-NAT LPs (0.275% PG, 10 mg/mL PC, 0.788% NaCl and 0.5% CMC)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions. Medium: Phosphate buffered solution isotonicized with NaCl (pH 7.4)	Release rate was statistically significant lower ($p < 0.05$) than simple solution of drug after 1 h	[63]
5-MCA-NAT LPs (0.275% PG, 10 mg/mL PC, 0.479% NaCl and PX)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink condition. Medium: Phosphate buffered solution isotonicized with NaCl (pH 7.4)	Release rate was statistically significant lower ($p < 0.003$) than simple solution of drug and NaCl dispersed LPs after 1 h and statistically significant lower ($p < 0.05$) than CMC dispersed LPs after 6-8 h	[63]
Elastic LPs PC:S (86:14 %w/w)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions. Medium: 10 mL of PBS (pH 6.5), 24 h at 37 °C and 100 rpm.	Release rate <i>via</i> dialysis membrane ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) was three and half times higher for elastic LPs than for rigid LPs	[65]
	<i>Ex vivo</i> skin permeation study. Method: Franz diffusion cell using human skin e.p.a = 1 cm ² , receiver cell volume= 10 mL of PBS (pH 6.5), 24 h at 37 °C and 100 rpm	Transdermal flux across human cadaver skin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) was 5 times higher for elastic LPs than for regular LPs and more than twelve times higher compared with a plane MLT solution. Elastic LPs showed a lower lag time	[65]
Ethosomes	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions. Medium: 10 mL of PBS (pH 6.5), 24 h at 37 °C and 100 rpm.	Four times higher compared with a rigid LPs	[69]
	<i>Ex vivo</i> skin permeation study. Method: Franz diffusion cell using human skin e.p.a = 1 cm ² , receiver cell volume= 10 mL of PBS (pH 6.5), 24 h at 37 °C and 100 rpm	Transdermal flux across human cadaver skin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) was 5.43 times higher for elastic LPs than for rigid LPs and 2.63 times higher compared with a hydroethanolic MLT solution. Elastic LPs showed a lower lag time compared with both	[69]
SLNs made of different combinations of DDAB, PA and SA	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions. Medium: water/ethanol solution (1:1, v/v)	PA or SA presence in formula reduced the amount of released drug	[82]
Lecithin/Chitosan MLT loaded polymeric NPs	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions over a 24 h period. Medium: acetate buffer solution, pH 5.6, at 37 °C	Decreased MLT release rate	[94]
	Caco-2 permeability assay. Medium: HBSS buffered with 30Mm of HEPES, pH 6.0.	Enhanced MLT permeability	[94]
	Mucoadhesive properties determined by the content of mucin adsorbed onto NPs suspended in mucin aqueous solution at pH 6.0	Prominent surface charge-dependent mucoadhesive properties	[94]

Table (3) contd....

Nanoplatform	Type of Study	Results	References
Lecithin/Chitosan MLT loaded polymeric NPs	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions over 5 h period. Medium: 30 mL of pH 5.8 acetate buffer solution at 37 °C.	L/C NPs have decreased release rate compared with MLT solution ($t_{50\%}$ values were 1.75 and 0.75 h, respectively)	[97]
	Permeability assay using an <i>in vitro</i> corneal epithelial model	Incorporation of MLT into L/C NPs significantly decreased its overall permeability compared to the MLT solution	[97]
PLGA and PLGA-PEG NPs 1% w/w (MLT/polymer)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions over a 15-days period. Medium: PBS, pH 7.5	24 h lag time followed by a controlled release profile. PLGA NPs gave a zero order release profile and PLGA-PEG more complex triphasic profile with a slower release.	[98]
	LOOH levels measurement as oxidative stress inhibition marker in a rat sepsis model	Both MLT NPs formulations significantly decreased LOOH levels	[98]
	RSH measurement as oxidative stress inhibition marker in a rat sepsis model	Both MLT NPs formulations restored RSH levels to those of the negative sepsis control group	[98]
PLGA and PLGA-PEG NPs 1% w/w (MLT/polymer)	<i>In vitro</i> release dialysis technique under sink conditions over a 15-days period. Medium: PBS, pH 7.5	Both MLT loaded NPs showed a lag time of 6 h. PLGA-PEG released 20% of MLT 24 h after administration and PLGA 50 h later.	[98]
Triglycerides + Eudragit® S100 + Span® 80 nanocapsules (0.5 mg/mL of MLT)	<i>In vitro</i> evaluation of lipid peroxidation inhibition using two different substrates: liposomes and microsomes	Enhancement of antioxidant properties of MLT against lipid peroxidation compared with a MLT simple solution.	[101]
Eudragit® S100 + Span® 80 nanospheres (0.5 mg/mL of MLT)	<i>In vitro</i> evaluation of lipid peroxidation inhibition using two different substrates: liposomes and microsomes	Enhancement of antioxidant properties of MLT against lipid peroxidation compared with a MLT simple solution.	[101]
PCL + MCTG + SM + PS80 lipid-core nanocapsules (MLT 0.125 mg/mL)	<i>In vitro</i> evaluation of cell viability, cytotoxicity and DNA damage inhibitions in a PQ-exposed lung cell model	Enhancement of therapeutic effect of MLT as DNA protector against PQ damages	[104]
GMA-EDA-β-CD MLT hydrogel	<i>In vitro</i> release study. Medium: aqueous NaCl solution of 0.1 mol L ⁻¹	Sustained release of MLT from GMA-EDA-β-CD MLT hydrogel compared with MLT hydrogel without MLT-β-CD complexes.	[108]

Notes: 5-MCA-NAT, 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine; PG, 1-2-propylene glycol; PC, phosphatidylcholine; SH, Sodium hyaluronate; CMC, sodium carboxymethylcellulose; PX, Poloxamer; LPs, liposomes; MLT, melatonin; S, soy; NPs, nanoparticles; PBS, Buffer phosphate; e.p.a, effective permeation area; SLNs, solid lipid nanoparticles; LOOH, lipid hydroperoxide; RSH, total thiol groups; DDAB, didecylidimethylammonium bromide; PA, palmitic acid; SA, stearic acid; L/C, lecithin/chitosan; PLGA, Poly-D,L-lactide-co-glycolide; PLGA-PEG, polyethylene glycol-co-(poly-D,L-lactide-co-glycolide); PCL, Poly-ε-caprolactone; MCTG, medium chain triglycerides; SM, dorbital monoesterate; PS80, polysorbate 80; PQ, paraquat; GMA, glycidyl methacrylate; EDA, ethylenediamine; β-CD, beta-cyclodextrin. HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; NaCl, sodium chloride.

Table 4. Summary of *in vivo* studies carried out with some MLT loaded nanocarriers.

Nanoplatform	Type of Study	Results	References
5-MCA-NAT simple solution and 5-MCA-NAT LPs (0.275% PG, 10 mg/mL PC and 0.788% NaCl) dispersed in NaCl, SH, CMC or PX	<i>In vivo</i> study of therapeutic efficacy as ocular hypotensive agent in rabbits	SH LPs showed the maximum hypotensive effect (39% IOP reduction), statistically significant higher than conventional LPs (NaCl). There were no significant differences between SH and CMC % IOP reduction, they presented the best results. For NaCl, SH and CMC LPs hypotensive effect was maintained for longer than 8 h. For LPs dispersed in PX hypotensive effect lasted only 5 h	[63]
5-MCA-NAT LPs (0.275% PG, 10 mg/mL PC and 0.788% NaCl), dispersed in SH or CMC	<i>In vivo</i> tear osmolality measurements	Tear osmolality diminished significantly at any time in comparison to basal	[63]
	<i>In vivo</i> short-term tolerance study	Animals showed no discomfort or irritation during the test or within 24 h after administration	[63]
SLNs made of different combinations of DDAB, PA and SA	<i>In vivo</i> study of therapeutic efficacy as ocular hypotensive agent in rabbits	SLNs that showed higher IOP reduction was composed of 0.1% (w/v) DDAB, 0.1% (w/v) PA, 0.05% (w/v) MLT and 0.05% (w/v) Tween® 80. This batch mean size was 222.9 ± 1 nm, showed a low polydispersity index, a zeta potential of +59.70 ± 0.52 mV, a drug encapsulation efficiency of 95.89% and 451.1 µg/mL of MLT	[82]
	<i>In vivo</i> short-term tolerance study	Formulations were well tolerated and the score for each parameter of Dryze test was zero at all time of observations	[82]
PLGA and PLGA-PEG NPs 1% w/w (MLT/polymer)	<i>In vivo</i> efficacy hypotensive study in rabbits. Parameter: Intraocular pressure (IOP)	Both tested NPs determined a prolonged lowering of IOP in rabbits, greater for the PLGA-PEG NPs in respect to free MLT and PLGA NPs	[99]
Span® 60:cholesterol:SDC: MLT (1:1:1:5) niosomes	<i>In vivo</i> intranasal delivery study in rats	MLT was distributed to liver, hypothalamus and testis. Any histological change was detected	[76]
Triglycerides + Eudragit® S100 + Span® 80 nanocapsules (0.5 mg/mL of MLT)	<i>In vivo</i> antioxidant efficacy study in mice. Parameter: MDA in brain and liver	MLT-loaded Nanocapsules showed significant lipid peroxidation inhibition ($p < 0.05$) against MLT aqueous solution which was ineffective	[112]
SLNs (3 mg of MLT)	<i>In vivo</i> , oral and transdermal administration, pharmacokinetic study	MLT-loaded SLNPs orally and transdermally administered showed delayed onset, longer mean half-life of elimination and MLT plasma levels maintained for 24 h	[81]

Notes: 5-MCA-NAT, 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine; PG, 1-2-propylene glycol; PC, phosphatidylcholine; SH, sodium hyaluronate; CMC, sodium carboxymethylcellulose; PX, poloxamer; LPs, liposomes; MLT, melatonin; S, soya; NPs, nanoparticles; e.p.a, effective permeation area; LOOH, lipid hydroperoxide; RSH, total thiol groups; IOP, high intraocular pressure; MDA, malondialdehyde; SDC, dimethyl sulfoxide/sodium deoxycholate; SLNs, solid lipid nanoparticles.

It would be interesting to have more data from *in vivo* studies carried out with these nanosystems, and for which, safety and toxicity considerations should be taken into account. From the composition perspective, liposomal systems, made of cholesterol and endogenous phospholipids, theoretically should be safer and more biocompatible tools than NPs. Although, as we have seen, *in vivo* ocular administration of MLT in tolerance studies of LPs and NPs showed greater tolerance for both nanosystems.

CONCLUSION

There are substantial works reporting effective MLT loaded nanosystems of different nature with promising results. Each of these nanosystems provides different alternatives to the dermal administration of MLT, increasing its absorption through mucous membranes, altering the release profile (delayed and / or sustained release), allowing increasing or enhancing the pharmacological

effect, improving bioavailability, increasing half-life, while some of them even preventing or minimizing certain side effects.

Obtained results of *in vivo* studies and toxicological data are encouraging for the future design of new experiments in order to investigate new MLT dermal delivery nanoplatforms that meet our requirements in terms of safety, stability and efficiency.

Future challenges should include the optimization of those nanosystems currently available to reach the clinical use, as well as, the creation of new nanocarriers for the MLT delivery that play an increasing role in the development of new pharmaceuticals applied to dermal delivery in mentioned pharmacotherapeutic areas.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

All authors have contributed substantially to the performance of this work. Aroha Sánchez carried out literature research and participated in the paper writing. Ana C. Calpena and Beatriz Claes designed the research and performed the critical review.

REFERENCES

- [1] Kohen, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress—new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.*, **1999**, *53*, 181-192.
- [2] Thiele, J. J. Oxidative targets in the stratum corneum. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2001**, *14*, 87-91.
- [3] Vile, G. F.; Tyrrell, R. M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 721-730.
- [4] Trouba, K. J.; Hamadeh, H. K.; Amin, R. P.; Germolec, D. R. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid. Redox Signal.*, **2002**, *4*, 665-673.
- [5] Wei, Y. H.; Lee, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.*, **2002**, *227*, 671-682.
- [6] World Health Organization. Ultraviolet Radiation and the INTER-SUN Programme. WHO: Geneva, **2003**; (who.int/tv/faq/skincancer/en/index1.html) (Accessed February 20, 2016).
- [7] Williamson, C. E.; Zepp, R. G.; Lucas, R. M.; Madronich, S.; Austin, A. T.; Ballaré, C. L.; Robinson, S. A.; Häder, D. P.; Bormann, J. F.; Paul, N. D. Solar ultraviolet radiation in a changing climate. *Nat. Clim. Change*, **2014**, *4*, 434-441.
- [8] Lademann, J.; Vergou, T.; Darvin, M.E.; Patzelt, A.; Meinke, M.C.; Voit, C.; Papakostas, D.; Zastrow, L.; Sterry, W.; Doucet, O. Influence of topical, systemic and combined application of antioxidants on the barrier properties of the human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2016**, *29*, 41-46.
- [9] Rostami, E.; Kashanian, A.; Azandaryani, A.H. Preparation of solid lipid Nps as drug carriers for levothyroxine sodium with *in vitro* drug delivery kinetic characterization. *Mol. Biol. Rep.*, **2014**, *41*, 3521-3527.
- [10] Moozgar, Z.; Wang, L.; Brandstotter, T.; Wallis, S.S.; Wilson, E.M.; Goldberg, M.S. Dual-layer surface coating of PLGA-based nanoparticles provides slow-release drug delivery to achieve metronomic therapy in a paclitaxel-resistant murine ovarian cancer model. *Biomacromolecules*, **2014**, *11*, 4187-4194.
- [11] Eddy, H.L.; Couvreur, P. Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases. *J. Hepatol.*, **2011**, *55*, 1461-1466.
- [12] Aik, S.R.; Desai, S.K.; Shah, P.D.; Wala, S.M. Liposomes as potential carrier system for targeted delivery of polyene antibiotics. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, **2013**, *7*, 202-214.
- [13] Eiris, P.M.; Deb, P.; Doolittle, E.; Doron, G.; Goldberg, A.; Govender, P.; Shah, S.; Rao, S.; Carbone, S.; Cotey, T.; Sylvestre, M.; Singh, S.; Schiemann, W.P.; Lee, Z.; Karathanasis, E. Vascular targeting of a gold nanoparticle to breast cancer metastasis. *J. Pharm. Sci.*, **2015**, *104*, 2600-2610.
- [14] Yang, T.; Sheng, H.H.; Feng, N.P.; Wei, H.; Wang, Z.T.; Wang, C.H. Preparation of andrographolide-loaded solid lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* evaluations: characteristics, release, absorption, transports, pharmacokinetics, and antihyperlipidemic activity. *J. Pharm. Sci.*, **2013**, *102*, 4414-4425.
- [15] Kurtoglu, Y.E.; Navath, R.S.; Wang, B.; Kannan, S.; Romero, R.; Kannan, R.M. Poly(amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulphide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2112-2121.
- [16] Rahaiee, S.; Shojaosadati, S.A.; Hashemi, M.; Moini, S.; Razavi, S.H. Improvement of crocin stability by biodegradable nanoparticles of chitosan-alginate. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *79*, 423-32.
- [17] Zubir, M.N.M.; Badarudin, A.; Kazi, S.N.; Misran, M.; Amiri, A.; Sadri, R.; Khalid, S. Experimental investigation on the use of highly charged nanoparticles to improve the stability of weakly charged colloidal system. *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, *454*, 245-255.
- [18] Luo, Y.; Wang, T.T.Y.; Teng, Z.; Chen, P.; Sun, J.; Wang, Q. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. *Food Chem.*, **2013**, *139*, 224-230.
- [19] Yi, J.; Lam, T.I.; Yokoyama, W.; Chen, L.W.; Zhong, F. Cellular uptake of β -carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization-evaporation method. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, *62*, 1096-1104.
- [20] Mahjub, R.; Radmehr, M.; Dorksoosh, F.A.; Ostad, S.N.; Rafiee-Tehrani, M. Lyophilized insulin Nps prepared from quaternized N-aryl derivatives of chitosan as a new strategy for oral delivery of insulin: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterizations. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2014**, *40*, 1645-1659.
- [21] Hosseini-nasab, S.; Pashaei-Asl, R.; Khandaghi, A.A.; Nasrabadi, H.T.; Nejatikoshki, K.; Akbarzadeh, A.; Joo, S.W.; Hanifehpour, Y.; Davaran, S. Synthesis, characterization, and *in vitro* studies of PLGA-PEG nanoparticles for oral insulin delivery. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2014**, *84*, 307-315.
- [22] Jin, X.; Zhang, Z.H.; Sun, E.; Tan, X.B.; Li, S.L.; Cheng, X.D.; You, M.; Jia, X.B. Enhanced oral absorption of 20(S)-protopanaxadiol by self-assembled liquid crystalline nanoparticles containing piperine: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Nanomed.*, **2013**, *8*, 641-652.
- [23] Liu, X.; Liu, C.; Zhang, W.; Xie, C.; Wei, G.; Lu, W. Oligoarginine-modified biodegradable nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin. *Int. J. Pharm.*, **2013**, *448*, 159-167.
- [24] Prow, W. T.; Grice, E.J.; Lin, L.L.; Faye, R.; Butler, M.; Becker, W.; Wurm, M. T. E.; Yoong, C.; Roberto, A. T.; Soyer, P.H.; Roberts, S.M. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2011**, *63*, 470-491.
- [25] Djekic, L.; Krajsnik, D.; Martinovic, M.; Djordjevic, D.; Primorac, M. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *490*, 180-189.
- [26] Sezer, A. D.; Kazak, H.; Öner, E. T.; Akbuğa, J. Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydr. Polym.*, **2011**, *84*, 358-363.
- [27] Kotyla, T.; Kuo, F.; Moolchandani, V.; Wilson, T.; Nicolosi, R. Increased bioavailability of a transdermal application of a nano-sized emulsion preparation. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *347*, 144-148.
- [28] Korkmaz, E.; Evren H.; Ozgen O. Development and evaluation of coenzyme Q10 loaded solid lipid nanoparticle hydrogel for enhanced dermal delivery. *Acta Pharm.*, **2013**, *63*, 517-529.
- [29] Xu, X.; Khan, M.A.; Burgess, D.J. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. *Int. J. Pharm.*, **2012**, *423*, 543-553.
- [30] Sánchez, A.; Calpena, A.C.; Claes, B. Evaluating oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 16981-17004.
- [31] Hardeband, R.; Pandi-perumal, S.R.; Cardinali, D.P. Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell B.*, **2006**, *380*, 313-331.
- [32] Nalaka, S.G.; Alena, Y.Z.E.; Chen Z.; Norma, C.; Michael, A. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. *J. Pineal. Res.*, **2012**, *52*, 437-445.
- [33] Mallo, C.; Zaidan, R.; Galy, G.; Wermeulen, E.; Brun, J.; Chazot, G.; Claustrate, B. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1990**, *38*, 297-301.
- [34] Shah, J.; Langmuir, V.; Gupta, S.K. Feasibility and functionality of OROS melatonin in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.*, **1999**, *39*, 606-612.
- [35] Markantonis, S.L.; Tsakalozou, E.; Paraskeva, A. Melatonin pharmacokinetics in premenopausal and postmenopausal healthy female volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, **2008**, *48*, 240-245.
- [36] Harpsøe, N.G.; Andersen, L.P.; Gøgenur, I.; Rosenberg, J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2015**, *71*, 901-909.
- [37] Zetner, D.; Andersen, P.H.; Rosenberg, J. Pharmacokinetics of alternative administration routes of melatonin: a systematic review. *Drug Res.*, **2016**, *66*, 169-173.
- [38] Flo, A.; Cambras, T.; Díez-Noguera, A.; Calpena, A. Melatonin pharmacokinetics after transdermal administration change according to the time of the day. *Eur. J. Pharm. Sciences*, **2017**, *96*, 164-170.

- [39] Li, X.; Wang, S. Binding of glutathione and melatonin to human serum albumin: A comparative study. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2015**, *125*, 96-103.
- [40] Singh, M.; Jadhav, H. R. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov. Today*, **2014**, *1*, 1410-1418.
- [41] Markey, S.P.; Higa, S.; Shih, M.; Danforth, D.N.; Tamarkin, L. The correlation between human plasma melatonin levels and urinary 6-hydroxymelatonin excretion. *Clin. Chim. Acta*, **1985**, *150*, 221-225.
- [42] Kim, T.K.; Kleszczynski, K.; Janjetovic, Z.; Sweatman, T.; Lin, Z.; Li, W.; Reiter, R.J.; Fischer, T.W.; Slominski, A.T. Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatoninergic pathway in human skin cells. *FASEB J.*, **2013**, *27*, 2742-2755.
- [43] Slominski, A.; Tobin, D.J.; Zmijewski, M.A.; Wortsman, J.; Paus, R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol. Metabol.*, **2008**, *19*, 17-24.
- [44] Pandi-Perumal, S.R.; Trakht, I.; Srinivasan, V.; Spence, D.W.; Maestroni, G.J.M.; Zisapel, N.; Cardinali, D.P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.*, **2008**, *85*, 335-353.
- [45] Fischer, T.W.; Greif, C.; Fluhr, J.W.; Wigger-Alberti, W.; Elsner, P. Percutaneous penetration of topically applied melatonin in a cream and an alcoholic solution. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2004**, *17*, 190-194.
- [46] Flo, A.; Calpena, A.C.; Halbault, L.; Araya, E.I.; Fernández, F.; Clares, B. Melatonin delivery: transdermal and transbuccal evaluation from different vehicles. *Pharm. Res.*, **2016**, *33*, 1615-1627.
- [47] Bangha, E.; Elsner, P.; Kistler, G.S. Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). Influence of the application time point. *Dermatology*, **1997**, *195*, 248-252.
- [48] Dreher, F.; Gabard, B.; Schwindt, D.A.; Maibach, H.I. Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study *in vivo*. *Br. J. Dermatol.*, **1998**, *139*, 332-339.
- [49] Marto J.; Ascenso A.; Gonçalves, L.M.; Gouveia, L.F.; Manteigas, P.; Pinto, P.; Oliveira, E.; Almeida, A.J.; Ribeiro, H.M. Melatonin-based pickering emulsion for skin's photoprotection. *Drug Deliv.*, **2016**, *11*, 1-14.
- [50] Wilson, V.G. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol. Biol.*, **2014**, *1195*, 33-41.
- [51] Meghrajani, C.F.; Co, H.C.; Ang-Tiu, C.M.; Roa, F.C. Topical corticosteroid therapy for the prevention of acute radiation dermatitis: a systematic review of randomized controlled trials. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **2013**, *6*, 641-649.
- [52] Rotellar, J.M.; Algara, M.; Foro, P.; Domínguez, M.; Blanch, A. Atención a los efectos secundarios de la radioterapia. *Medifam.*, **2002**, *12*, 16-33.
- [53] Sanchez-Barcelo, E.J.; Mediavilla, M. D.; Alonso-Gonzalez, C.; Reiter, R.J. Melatonin uses in oncology: breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. *Expert Opin. Inv. Drug.*, **2012**, *6*, 819-831.
- [54] Sierra, A.F.; Ramirez, M.L.; Campmany, A.C.; Martinez, A.R.; Naveros, B.C. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.*, **2013**, *69*, 202-214.
- [55] Lasic, D.; Papahadjopoulos, D. Liposomes revisited. *Science*, **1995**, *267*, 1275-1276.
- [56] Josimar, O.E.; Marina, C.S.; Raquel, P.; Juliana, P.A.B.; Robert, J.L.; Juliana, M.M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2014**, *123*, 345-363.
- [57] Soon-Seok, H.; So, H.K.; Soo-Jeong, L. Effects of triglycerides on the hydrophobic drug loading capacity of saturated phosphatidylcholine-based liposomes. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *483*, 142-150.
- [58] Livia, P.M.; Jorge Miguel, F.D.; Angela Danieal, A.C.; Macerlo, S.V.; Poliana, L.B.; Eliana, M.L.; Marize, C.V. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicol. Vitro*, **2015**, *29*, 1268-1274.
- [59] Mikako, O.; Ryuji, U.; Ayumi, K.; Mutsumi, K.; Yasuhiro, M. PEG modification on In-labeled phosphatidyl serine liposomes for imaging of atherosclerotic plaques. *Nucl. Med. Biol.*, **2015**, *42*, 299-304.
- [60] Torchilin, V. P. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials*, **2001**, *22*, 3035-3044.
- [61] Lianhua, C.; Moon-Hee, Na.; Hyun-Kyung, J.; Sri, M. P.V.; Cheong-Wun, K.; Guruprasath, P.; Tae-In, P.; Jae-Yong, P.; Ilseon, H.; Keon, U.P.; Frank, L.; Maggie, L.; Jihoo, P.; In-San, K.; Byung-Heon, L. Enhanced delivery of liposomes to lung tumor through targeting interleukin-4 receptor on both tumor cells and tumor endothelial cells. *J. Control. Release*, **2015**, *209*, 327-336.
- [62] Meng, C.; Wei, W.; Lars, H.; Yi, L.; Dawei, C.; Jianping, Q. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *489*, 277-284.
- [63] Quinteros, D.; Vicario-de-la-Torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Palma, S.; Allemandi, D.; Herrero-Venrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Hybrid formulations of liposomes and bioadhesive polymers improve the hypotensive effect of the melatonin analogue 5-MCA-NAT in rabbit eyes. *Plos One*, **2014**, *9*, e110344.
- [64] Marchetti, C.; Sidahmed-Adrar, N.; Collin, F.; Jore, D.; Gardés-Albert, M.; Bonnefont-Rousselot, D. Melatonin protects PLPC liposomes and LDL towards radical-induced oxidation. *J. Pineal Res.*, **2011**, *51*, 286-296.
- [65] Dubey, V.; Mishra, D.; Athana, A.; Jain, N.K. Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3491-3496.
- [66] Ipek, S.; Feride, S.; Nadide, K. Melatonin induces opposite effects on order and dynamics of anionic DPPG model membranes. *J. Mol. Struct.*, **2007**, *834*, 195-201.
- [67] Toutiou, E.; Junginger, H.E.; Weiner, N.D.; Mezei, M. Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. *J. Pharm. Sci.*, **1992**, *9*, 1189-1203.
- [68] Fan, C.; Li, X.; Zhou, Y.; Zhao, Y.; Ma, S.; Li, W.; Liu, Y.; Li, G. Enhanced topical delivery of tetrandrine by ethosomes for treatment of arthritis. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, *2013*, 161943.
- [69] Dubey, V.; Mishra, D.; Jain, N.K. Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2007**, *67*, 398-405.
- [70] Seongyeol, Y.; Bong, S.S.; Sanghwa, H. An electron spin resonance study of non-ionic surfactant vesicles (niosomes). *Chem. Phys. Lipids*, **2014**, *181*, 83-89.
- [71] Manosroi, A.; Khanrin, P.; Lohcharenkal, W.; Werner, R.G.; Götz, F.; Manosroi, W.; Manosroi, J. Transdermal absorption enhancement through rat skin of gallidermin loaded in niosomes. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *392*, 304-310.
- [72] Muzzalupo, R.; Tavano, L.; Cassano, R.; Trombino, S.; Ferrarelli, T.; Picci, N. A new approach for the evaluation of niosomes as effective transdermal drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2011**, *79*, 28-35.
- [73] Kopernsub, P.; Mayen, V.; Warin, C. Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 605-612.
- [74] Abdelbary, A. A.; AbouGhaly, M. H. Design and optimization of topical methotrexate loaded niosomes for enhanced management of psoriasis: Application of Box-Behnken design, in-vitro evaluation and in-vivo skin deposition study. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *485*, 235-243.
- [75] Shaker, D. S.; Shaker, M. A.; Hanafy, M. S. Cellular uptake, cytotoxicity and in-vivo evaluation of Tamoxifen citrate loaded niosomes. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *493*, 285-294.
- [76] Priprem, A.; Limphirat, W.; Limisitthichaikoon, S.; Johns, R.J.; Mahakunakorn, P. Intranasal delivery of nanosized melatonin-encapsulated niosomes in rats. *Open Access Sci. Rep.*, **2012**, *1*, 232-237.
- [77] Wolfgang, M.; Karsten, M. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *47*, 165-196.
- [78] Dal Pizzol, C.; Branco, F.F.; Sierra, J.A.R.; Pittella, F.; Henrique, S.A.; Alves de Souza, P.; Machado de Campos, A.; Creczynski-Pasa, T.B. Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2014**, *11*, 8581-8596.
- [79] Priyanka, K.; Sathali, A.A. Preparation and evaluation of montelukast sodium loaded solid lipid nanoparticles. *J. Young Pharm.*, **2012**, *4*, 129-137.
- [80] Pradhan, M.; Singh, D.; Rawat, S.M. Influence of selected variables of fabrication of Triamcinolone acetonide loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of dermal disorders. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **2014**, *17*, 1-9.

- [81] Charoenputtakhu, P.; Opanasopit P.; Rojanarata T.; Ngawhirunpat T. All-trans retinoic acid-loaded lipid nanoparticles as a transdermal drug delivery carrier. *Pharm. Dev. Technol.*, **2014**, *19*, 164-172.
- [82] Leonardi, A.; Bucolo, C.; Drago, F.; Salomone, S.; Pignatello, R. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *478*, 180-186.
- [83] So, J.L.; Ji, Y.Y.; Sun, H.K.; Ick, C.K.; Kwangmeyung, K. Biocompatible gelatin nanoparticles for tumor-targeted delivery of polymerized siRNA in tumor-bearing mice. *J. Control. Release*, **2013**, *172*, 358-366.
- [84] Purnima, V.; Munish, A. Optimization, characterization and evaluation of chitosan-tailored cubic Nps of clotrimazole. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *73*, 138-145.
- [85] Elsayed, M.; Huan, J.; Edirisinghe, M. Bioinspired preparation of alginate nanoparticles using microbubble bursting. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **2015**, *46*, 132-139.
- [86] Ayadi, F.; Bayer, I. S.; Marras, S.; Athanassiou, A. Synthesis of water dispersed nanoparticles from different polysaccharides and their application in drug release. *Carbohydr. Polym.*, **2016**, *136*, 282-291.
- [87] Martín-Banderas, L.; Muñoz-Rubio, I.; Prados, J.; Álvarez-Fuentes, J.; Calderón-Montaño, J.M.; López-Lázaro, M.; Arias, J.L.; Leiva, M.C.; Holgado, M.A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *487*, 205-212.
- [88] Yordanov, G.; Evangelatov, A.; Skrobanska, R. Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Preparation and *in vitro* evaluation in human lung adenocarcinoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2013**, *107*, 115-123.
- [89] Karanam, V.; Marslin, G.; Krishnamoorthy, B.; Chellan, V.; Siram, K.; Natarajan, T.; Bhaskar, B. Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles of carboplatin: Preparation characterization and *in vitro* cytotoxicity evaluation in U-87 MG cell lines. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2015**, *130*, 48-52.
- [90] Barbieri, S.; Buttini, F.; Rossi, A.; Bettini, R.; Colombo, P.; Ponchel, G.; Sonvico, F.; Colombo, G. Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan Nps. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *491*, 99-104.
- [91] Wang, G.; Uludag, H. Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targeting systems with emphasis on protein-based Nps. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2008**, *5*, 499-515.
- [92] Jang, K.K.; Hyung, J.K.; Jee-Young, C.; Jong-Hwan, L.; Seok-Beom, Y.; Yong-Hee, K. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. *Arch. Pharm. Res.*, **2014**, *37*, 60-68.
- [93] Xue-Qing, W.; Qiang, Z. pH sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2012**, *82*, 219-229.
- [94] Hafner, A.; Lovrić, J.; Voinovich, D.; Filipović-Grcić, J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *381*, 205-213.
- [95] Hafner, A.; Durrigl, M.; Pepic, I.; Filipović-Grcić, J. Short- and Long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. *Chem. Pharm. Bull.*, **2011**, *59*, 1117-1123.
- [96] Hafner, A.; Lovrić, J.; Pepic, I.; Filipović-Grcić, J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J. Microencapsul.*, **2011**, *28*, 807-815.
- [97] Hafner, A.; Lovrić, J.; Duvnjak, M.R.; Juretic, M.; Pepic, I.; Cetina-Cizmek, B.; Filipović-Grcić, J. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2015**, *75*, 142-150.
- [98] Giovanni, L.V.; Teresa, M.; Rosario, P.; Paolo, M.; Ignazio, B.; Claudia, C.; Antonio G.; Giovanni, P. Antioxidant potential of different melatonin-loaded nanomedicines in an experimental model of sepsis. *Exp. Biol. Med.*, **2012**, *237*, 670-677.
- [99] Musumeci, T.; Bucolo, C.; Carbone, C.; Pignatello, R.; Drago, F.; Puglisi, G. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. *Int. J. Pharm.*, **2013**, *440*, 135-140.
- [100] Musumeci, T.; Ventura, C.A.; Giannone, I.; Ruozi, B.; Montenegro, L.; Pignatello, R.; Puglisi, G. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *325*, 172-179.
- [101] Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; de Cordova, C.A.S.; Creczynski-Pasa, T.B.; Guterres, S.S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *289*, 209-213.
- [102] Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, **1989**, *55*, R1-R4.
- [103] Charao, F.M.; Baierle, M.; Gauer, B.; Goethel, G.; Fracasso, R.; Paese, K.; Brucker, N.; Moro, M.A.; Bubols, B.G.; Dias, B.B.; Matte, S.U.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Garcia, S.C. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core Nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **2015**, *784-785*, 1-9.
- [104] Jornada, S.D.; Fiel, A.L.; Bueno, K.; Gerent, J.F.; Petzhold, L.C.; Beck, C.R.R.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Lipid-core Nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*, **2012**, *8*, 6646-6655.
- [105] Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilisation and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, **1996**, *85*, 1017-25.
- [106] Bibby, D.C.; Davies, N.M.; Tucker, I.G. Mechanism by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, **2000**, *197*, 1-11.
- [107] Bongiorno, D.; Ceraulo, L.; Mele, A.; Panzeri, W.; Selva, A.; Turco L.V. Structural and physicochemical characterization of the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin. *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 743-754.
- [108] Yu-Yang, L.; Xiao-Dong, F. Synthesis, properties and controlled release behaviors of hydrogel networks using cyclodextrin as pendant groups. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 6367-6374.
- [109] Keller, B. C. Liposomes in nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, **2001**, *12*, 25-31.
- [110] Keller, B. C. Delivery of biologically active material in a liposomal formulation for administration into the mouth. U.S. Patent 20020048551, April 25, 2002.
- [111] Priano, L.; Esposti, D.; Esposti, R.; Castagna, G.; De Medici, C.; Frascini, F.; Gasco, M.R.; Mauro, A. Solid Lipid Nanoparticles Incorporation Melatonin as New Model for Sustained Oral and Transdermal Delivery Systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2007**, *7*, 3596-3601.
- [112] Schaffazick, S.R.; Siqueira, I.R.; Badojo, A.S.; Jornada, D.S.; Pohlmann, A.R.; Netto, C.A.; Guterres, S.S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *69*, 64-71.
- [113] Qian S.; Li, C.; Zuo, Z. Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded liposomes. *Curr. Drug Metab.*, **2012**, *13*, 372-395.

8. Artículo 5 (Artículo de opinión)

Anti-inflammatory nanomedicines: What does the future hold?

(Nanomedicinas antiinflamatorias: ¿Qué nos depara el futuro?)

Autores: Aroha B. Sánchez, Jose Luis Soriano, Ana C. Calpena, Patricia Gálvez, Beatriz Clares.

Nanomedicine; Aceptado Marzo 2020.

Índice de impacto: 4.717 (ISI Journal Citations Reports)

Categoría: Medicina (Q1)
Ingeniería biomédica (Q1)

Article Body Template

- **Keywords:** anti-inflammatory drugs, nanomedicine, challenges, commercialization.
- **Main body of text:**

Anti-inflammatory drugs

Anti-inflammatory drugs constitute the backbone of treatment for most diseases. In fact, there is a direct relationship between chronic inflammation and many emerging disorders like cancer, oral diseases, kidney diseases, fibromyalgia, gastrointestinal chronic diseases or rheumatic diseases [1]. Steroidal anti-inflammatory drugs (SAIDs) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are key contributors in the treatment of acute inflammatory pain conditions such as headache, postoperative pain and orthopedic fractures as well as in the management of chronic inflammatory pain and inflammatory diseases like rheumatoid arthritis, osteoarthritis and gout and for ocular diseases [2]. The principal therapeutic applications of NSAIDs are related to pain, fever and they can also be used as a prophylaxis treatment after first coronary or cerebrovascular ischemic event, this is one of the most important usages of acetylsalicylic acid (ASA) [3]. Principal therapeutic areas for SAIDs are allergic rhinitis (nasally administered) [4], asthma [5], nasal polyposis and chronic rhinosinusitis [6,7]. Orally administered prednisolone, a SAID, is indicated in bronchial asthma, allergic and inflammatory disorders, rheumatoid arthritis and other collagenopathies, dermatitis and dermatoses such as subacute and chronic eczema, psoriasis, pemphigus.

Worldwide anti-inflammatory drug consumption

Nowadays, anti-inflammatory medications are one of the most consumed type of drugs worldwide. According to the commercial source of drug utilization IQVIA [8] in 2019, ASA, diclofenac (DIC) and ibuprofen (IB) were the three main NSAIDs consumed worldwide. From September 2018 to September 2019 more than 335,000 million standard units or doses were sold. NSAIDs consumption is reported to be a bit higher than SAIDs. The leading market share of NSAIDs and SAIDs market is located in Europe and Southeast Asia.

In Europe, the market is dominated by NSAIDs, with sales of ASA, DIC and IB exceeding 12,000 million standard units a year and 16,000 million in the case of ASA. SAIDs also represent a huge market in Europe, among them (in decreasing order) mometasone, beclomethasone, fluticasone and the combination of beclomethasone and formoterol.

Concerning the delivery routes of the three most consumed SAIDs worldwide mometasone, fluticasone and prednisolone, the nasal route is predominant (54.7%), followed by the oral (21.6%) and ophthalmic routes (9.9%), but it depends on the drug. This data refers to the year 2019 [8].

Limitations of convectional anti-inflammatory therapies

Unfortunately current anti-inflammatory therapies are unable to achieve the best conditions of efficacy and safety. It is also important to highlight that anti-inflammatory drugs lead to very expensive and serious adverse events, such as gastrointestinal, cardiovascular, and renal complications that involve health risks and can have a great economic impact. These side effects have, mainly been studied for NSAIDs [9], but side effects limit the use of SAIDs [10].

Article Body Template

The efficacy of the anti-inflammatory therapies could be considered as the result of a delicate balance between the potency of the drug and side effects on healthy organs. Doses of these drugs are generally limited to values below the therapeutic dose, with an aim to prevent side effects. However, this often results in an insufficient amount of the active drug reaching the site of action, especially in hard to access areas such as articular cavities or different ocular structures, with a consequent loss of effectiveness. In other circumstances, administration can be severely limited by the development of tolerance, resistance or the inability of the drug to reach the biophase, and thus circulating within the whole organism.

Nanotechnological approaches for delivering anti-inflammatory drugs

To overcome these problems researchers have focused on the design and development of a multitude of different anti-inflammatory nanomedicines by associating of these drugs with nano-delivery systems. These newly developed drug delivery systems allow for the control of the LADME biological pathway, and can eventually improve the bioavailability of anti-inflammatory drugs. The technological characteristics of these nanomedicines will enable: (i) the improvement of unfavorable physicochemical properties of the anti-inflammatory drugs, such as poor water solubility; (ii) the protection against inactivation chemical, enzymatic or immunological processes from the site of administration to the biophase, as well as against degradation processes that might arise during storage; (iii) the reduction of interactions with the mononuclear phagocyte system, hence prolonging circulation in the bloodstream; (iv) the facilitation of drug release at an intracellular level, allowing it to pass across different biological barriers and overcome drug resistance mechanisms; and (v) the transport and controlled drug delivery to the biophase achieving higher dose accumulation in the inflamed area and decrease of undesirable side effects.

In relation to the prevention of the anti-inflammatory drugs adverse events different strategies have been explored in elementary research. The use of nanoparticles as carriers of glucocorticoids showed a significant reduction of toxic effects in different studies [11,12]. Another strategy focused on the prevention of gastrointestinal (GI) adverse effects is related to the use of antioxidants [13,14]. This is because there is evidence of the involvement of multiple cellular pathways in NSAIDs-mediated-GI damage, related to the redox state of enterocyte. In this area, nanoparticle-based systems [15] have shown an enhanced efficacy in the suppression of NSAID-induced small intestinal inflammation by improving the accumulation of the redox molecules can be found.

Anti-inflammatory nanomedicines in the clinic

With regard to nanotechnology-based pharmaceutical formulations there are few commercially available medicines. Nanofast[®] gel, a nanoemulsion containing sodium diclofenac, methyl salicylate and menthol. Oxalgil Nano[®] gel, also a sodium diclofenac nanoemulsion and Nanomax[®], a nanoemulsion consisting of diclofenac, linseed oil, methylsalicylate and menthol are all nanomedical approaches that can be used for topical treatment to improve the absorption of the drug across the skin. Another product, Zilretta[®] consists of triamcinolone acetonide formulated into poly lactic-co-glycolic acid microspheres. Poly lactic-co-glycolic acid was approved by US Food and Drug Administration (FDA) in 2017 for knee osteoarthritis treatment. Zilretta[®] was designed for intra-articular injection delivery, despite of positive results on clinical trials; it didn't show better results than the immediate release formulation, a crystalline suspension of triamcinolone acetonide [16]. However, Zilretta[®] enables a sustained release of the active drug in the synovium, providing a prolonged action, which lessens the systemic exposure and the adverse side effects related to conventional therapy.

Article Body Template

In August 2018, the US FDA approved a loteprednol etabonate ophthalmic suspension 1%, Inveltys[®], which is powered by Amplify[™] a drug delivery technology utilizing mucus-penetrating particles. These are selectively-sized nanoparticles with non-covalent proprietary coatings. Loteprednol etabonate has a good potency for different inflammatory eye diseases. However, it has a low efficiency due to its rapid metabolism [17]. Therefore, Inveltys[®] is designed to enhance penetration through the mucus barrier and deliver an increased concentration of loteprednol etabonate to the target ocular tissue [18].

In relation to new nano-based products in clinical trials Nanocort[®], a PEG-liposomal prednisolone sodium phosphate, is being testing for the treatment of rheumatoid arthritis, arteriovenous fistula, Graves' ophthalmopathy, atherosclerosis and ulcerative colitis. The most advanced trial of which is a Phase III clinical trial in rheumatoid arthritis [19]. The safety of the treatment with Nanocort[®] has been demonstrated previously. However, around 9.7% of patients treated with Nanocort[®] complained of infusion reaction and 2.7% sensed an acute infusion reaction.

It has been also reported that the use of an ophthalmic dexamethasone cyclodextrine nanoparticle suspension has optimal results [20]. In this pilot study the nano-system is reported to have significant efficacy against uveitic macular edema and vitritis.

Attention should also be drawn to the advances achieved in anti-inflammatory therapy by extracellular vesicles (EVs) as new drug delivery platform for anti-inflammatory drugs [21]. EVs are nano-sized membrane derived vesicles released by almost all cell types, including exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. These nano-systems can overcome limitations related to immunogenicity, transport, targeting and toxicity of conventional drug delivery platforms. Several clinical trials [22], and other reported studies [23-25] have demonstrated the efficacy and safety of EVs loaded with the anti-inflammatory drugs.

Additionally, recent research has focused on the therapeutic effects in inflammatory diseases of adipose-derived mesenchymal stem cells and other biogenic nanoparticles obtained directly from lipoaspirate. They were demonstrated to offer a therapeutic alternative in the treatment of pathologies such as arthritis rheumatoid, lupus, atherosclerosis and Crohn's disease [26,27].

Anti-inflammatory nanomedicines: a future perspective

Notwithstanding the reported advantages provided by nanotechnology and the optimistic predictions about anti-inflammatory nanomedicines made by researchers on the basis of development of different generations of nano-systems by vascular permeability, overexpression of biomarkers, immunomodulation and macrophage repolarization [28], anti-inflammatory nanomedicines have not been yet fully established commercially. In this context, only certain areas such as cancer therapeutics have been increased in the clinical translation and commercialization [29].

We would therefore identify the problem in areas such as inflammation, and evaluate if some of these diseases are underestimated due to their reduced mortality. While in the short term, most of these types of diseases are not fatal, they have a high impact on quality of life. Perhaps, the problem lies in the cost-effectiveness balance, which is an important issue for health systems. Equally, other crucial aspects like large-scale manufacturing, toxicity and safety, industrial property and government regulations must be analyzed in detail in comparison with currently available therapies [30].

Article Body Template

All these dimensions override the successful results already obtained at laboratory level and hinder their clinical translation. Therefore, the future should be aimed to reconciling the technological, clinical and economic value by collaboration between regulators, industry, practitioners and academia.

References:

1. Oyinloye BE, Adenowo AF, Kappo AP. Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 8(2), 151–175 (2015).
2. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pain Res.* 8, 105–118 (2015).
3. Jenny JY, Pabinger I, Samama CM; ESA VTE Guidelines Task Force. European guidelines on perioperative venous thromboembolism prophylaxis: Aspirin. *Eur. J. Anaesthesiol.* 35(2), 123–129 (2018).
4. Segboer C, Gevorgyan A, Avdeeva K *et al.* Intranasal corticosteroids for non-allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 11, CD010592 (2019).
5. Rogliani P, Matera MG, Facciolo F, Page C, Cazzola M, Calzetta L. Beclomethasone dipropionate, formoterol fumarate and glycopyrronium bromide: Synergy of triple combination therapy on human airway smooth muscle *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 2020, 1–14 (2020).
6. Kern RC, Stolovitzky JP, Silvers SL *et al.* A phase 3 trial of mometasone furoate sinus implants for chronic sinusitis with recurrent nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 8(4), 471–481 (2018).
7. Philpott, C, Erskine, S, Smith, R *et al.* Current use of baseline medical treatment in chronic rhinosinusitis: Data from the national chronic rhinosinusitis epidemiology study (CRES). *Clin. Otolaryngol.* 43, 509–524 (2018).
8. IQVIA Inc. <https://www.iqvia.com>. Accessed 2 February 2020.
9. Cooper C, Chapurlat R, Al-Daghri N *et al.* Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: What does the literature say?. *Drugs Aging* 36(Suppl 1), 15–24 (2019).
10. Vandewalle J, Luybaert A, De Bosscher K, Libert C. therapeutic mechanisms of glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 29(1), 42–54 (2018).
11. Irfan M, Katas H, Cairul M *et al.* In-vivo dermal pharmacokinetics, efficacy, and safety of skin targeting nanoparticles for corticosteroid treatment of atopic dermatitis. *Int. J. Pharm.* 507(1–2), 72–82 (2016)
12. Montes-cobos E, Ring S, Fischer HJ *et al.* Targeted delivery of glucocorticoids to macrophages in a mouse model of multiple sclerosis using inorganic-organic hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 245, 157–169 (2017).
13. Borghi SM, Fattori V, Ruiz-miyazawa KW *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF- κ B activity. *Life Sciences* 208, 221–231 (2018).

Article Body Template

14. Sánchez AB, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Fábrega MJ, Calpena AC. Study of melatonin as preventive agent of gastrointestinal damage induced by sodium diclofenac. *Cells* 9(1), 180 (2020).
15. Yoshitomi T, Sha S, Vong LB *et al.* Indomethacin-loaded redox nanoparticles improve oral bioavailability of indomethacin and suppress its small intestinal inflammation. *Ther. Deliv.* 5(1), 29–38 (2014).
16. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi, M. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine (Lond.)* 14(1), 93–126 (2019).
17. Comstock TL, Sheppard JD. Loteprednol etabonate for inflammatory conditions of the anterior segment of the eye: twenty years of clinical experience with a retrometabolically designed corticosteroid. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 19(4), 337-353 (2018).
18. Schopf L, Enlow E, Popov A, Bourassa J, Chen H. Ocular pharmacokinetics of a novel loteprednol etabonate 0.4% ophthalmic formulation. *Ophthalmol. Ther.* 3(1–2), 63-72 (2014).
19. A phase III, randomized, double-blind, double dummy, active controlled, multi-center study to evaluate the efficacy and safety of intravenous pegylated liposomal prednisolone sodium phosphate (Nanocort) compared with intramuscular injection of methylprednisolone acetate in subjects with active rheumatoid arthritis. NCT02534896. <https://www.clinicaltrials.gov>. Accessed 13 March 2020.
20. Imamachi K, Stefánsson E, Ohira A, Tanito M. Treatment of non-infectious ophthalmic inflammatory diseases with 1.5% dexamethasone γ -cyclodextrin nanoparticle eye drops. *Acta Ophthalmol.* 97(8), 824-827 (2019).
21. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106(Pt A), 148-156 (2016).
22. Miller D. Study investigating the ability of plant exosomes to deliver curcumin to normal and colon cancer tissue. NCT01294072. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01294072#wrapper>
23. Sun D, Zhuang X, Xiang X, *et al.* A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol. Ther.* 18(9), 1606-1614 (2010).
24. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, *et al.* Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J. Control. Release* 207, 18-30 (2015).
25. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, *et al.* Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther.* 19(10), 1769-1779 (2011).
26. Tian M, Ticer T, Wang Q, *et al.* Adipose-derived biogenic nanoparticles for suppression of inflammation. *Small* 18, e1904064 (2020).
27. Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and other extracellular vesicles as new remedies in the therapy of inflammatory diseases. *Cells* 8(12), E1605 (2019).
28. Al-Lawati H, Binkhathlan Z, Lavasanifar A. Nanomedicine for the effective and safe delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of preclinical research. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 142, 179-194 (2019).

Article Body Template

29. Balasubramanian V, Liu Z, Hirvonen J, Santos HA. Bridging the knowledge of different worlds to understand the big picture of cancer nanomedicines. *Adv. Health Mater.* 7, 1700432 (2018).
30. Hua S, de Matos MBC, Metselaar JM, Storm G. Current trends and challenges in the clinical translation of nanoparticulate nanomedicines: Pathways for translational development and commercialization. *Front. Pharmacol.* 9, 790 (2018).