

fosfato deshidr**ogenasa (G6PDH) en células de carcinoma de riñón hu**mano HEK-293T, mediante la té**cnica del ARN d**e interferencia Beatriz Gutiérrez, Juan P. Bolaños / **Detección y prevención de la hip**ercolesterolemia en los pacie<u>ntes que acuden</u> a la oficina de farmacia atención farmacéutica. Irene Suárez Antuña; María del Pilar Aldasoro Martín / Caracterización y separación de liposomas por de óxido de hierro como matrices de liberación controlada. Bladimir Vega; Margarita del Arco; Cristina Martín; Marcelino Zazo; Víctor Raposo / Atención farmacéutica en osteoporosis en la mujer postmenopáusica. Beatriz Cartujo; Pilar Aldasoro / Evaluación de las intervenciones en salud materno-infantil en África subsahariana. Almudena Óvilo; Luis Félix Valero; Ramona Mateos / Atención farmacéutica en DMAE (Degeneración Macular Asociada a la Edad). Lucía Fernández; Javier Muñoz / Nanomedicina en el siglo xxi. ¿un avance contra la enfermedad? Rosa Hernández Martín / El mundo de los biofármacos y los nuevos horizontes terapéuticos. Francisco Zaragoza García / Apoptosis: el suicidio celular es un proceso saludable para nuestra vida. José María Recio Pascual / Actualización en vacunas desde el punto de vista de la epidemiología de las enfermedades. Teresa M.ª Muñoz Cidad / I mesa redonda de becarios de la Facultad de Farmacia de Salamanca. Ana Jiménez López; Pilar Liceras Boíllos; Jonás Samuel Pérez Blanco / Hábitats y vegetación natural en la alta montaña del parque regional de la sierra de Gredos (Castilla y León, Ávila), Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata / Biotech development. Juan R. García Soria / Enfermedades emergentes: la amenada del ébola. Mar Lago Núñez / El debate homeopático. Jesús Fernández-Pérez / Farmacia y universidad. Resumen intervención de Fidel Ortega en la edición Farmaforum 2015, celebrado el día 6 de mayor en Salamanca. Fidel Ortega-Ortiz de Apodaca / Tratamiento de la hepatitis C: situación actual y perspectivas futuras. Silvio Ragozzino / Alimentos transgénicos. Pedro F. Mateos / Valoración de la técnica SmMIT-LAMP para la selección molecular de ADN de Schistosoma mansoni en muestras de orina. Cristina Martín; Pedro Fernández-Soto; Antonio Muro Estudio del proteoma en Malaria. Jesús Morán; Darwin A. Moreno-Pérez; Manuel A. Matarroyo; Antonio Muro / Evaluación del efecto de La cloroquina sobre la autofagia en células tumorales de mama y su posible utilidad como fármaco antineoplásico. Claudia Orallo Luna; Rogelio González Sarmiento / Diseño de una formulación de liposomas para la administración de vacunas. Óscar Delgado Rubio; M.ª José de Jesús Valle; Amparo Sánchez Navarro / PRMs detectados en pacientes en tratamiento con digoxina en urgencias. Laura García Jiménez; Ana María Martín Suárez / Silenciamiento de la glucosa-6.fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en células de carcinoma de riñón humano HEK-293T, mediante la técnica del ARN de interferencia. Beatriz Gutiérrez; Juan P. Bolaños / Detección y prevención de la hipercolesterolemia en los pacientes que acuden a la oficina de farmacia atención farmacéutica, Irene Suárez Antuña: María del Pilar Aldasoro Martín / Caracterización y separación de liposomas por microencapsulación. María José Sánchez Carpintero; Amparo Sánchez Navarro; Mariá José de Jesús Valle / Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como matrices de liberación controlada Bladimir Vega; Margarita del Arco; Cristina Martín; Marcelino Zazo; Víctor Raposo / Atención farmacéutica en osteoporosis en la mujer Almudena Óvilo; Luis Félix Valero; Ramona Mateos / Atención farmacéutica en DMAE (Degeneración Macular Asociada a la Edad) Lucía Fernánde<mark>z; Javier Muñoz / Nanomedicina en el siglo xxı: ¿un avance contra la enfermedad? Rosa Her</mark>nández Martín / El mundo de los biofármacos y los nuevos horizontes terapéuticos. Francisco Zaragoza Garcia / Apoptosis: el suicidio celular es un proceso saludable para nuestra vida. José María Recio Pascual / Actualización en vacunas desde el punto de vista de la epidemiología de las enfermedades. Teresa M.ª Muñoz Cidad / I mesa redonda de becarios de la Facultad de Farmacia de Salamanca. Ana Jiménez López;





# farmajournal

e-ISSN: [pendiente de concesión]

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2016, vol. 1, n. 1

# EDICIONES UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DIRECCIÓN: Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain

COMITÉ EDITORIAL: Antonio MURO ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain

Dra. Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca

Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLË

AYUDANTE DE DIRECCIÓN: Myriam GONZÁLEZ DÍAZ, Universidad de Salamanca, Spain

COMITÉ CIENTÍFICO: Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain

Antonio MURO ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLË, Universidad de Salamanca, Spain

CORRECTOR DE ORIGINALES: Iván PÉREZ MIRANDA, Spain

SECRETARÍA DE REDACCIÓN: Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca

Campus Miguel de Unamuno, s/n - 37008 Salamanca, España

El comité científico de *FarmaJournal* quiere agradecer la colaboración durante el proceso de revisión de los artículos de investigación publicados en este número, a los siguientes profesores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca:

María Jesús Almendral Parra, Francisco Javier Burguillo Muñoz, María Victoria Calvo Hernández, Javier Domínguez Álvarez, Montserrat Dueñas Patón, Alejandro Esteller Pérez, María del Mar Fernández de Gatta, Emilio Fernández Sánchez, Mónica García Domingo, María José García Sánchez, Luis García Sevillano, María Jesús de la Concepción Holgado Manzanera, Cristina Maderuelo Martín, Bernarda Marcos Laso, María Luisa Martín Calvo, María Rita Martín Muñoz, Gloria María Miranda García, Ana Isabel Morales Martín, Javier Muñoz González, Ana Vega Ortiz de Urbina Angoso, Rafael Peláez Lamamiec de Clairac Arroyo, María de la Concepción Pérez Melero, María del Pilar Puebla Ibáñez, Rosana Ramos Aparicio, Juan Antonio Sánchez Rodríguez, María Luisa Sayalero Marinero, Fernando Simón Martín, Cipriano Jesús Valle Gutiérrez y Santiago Vicente Tavera

FARMAJOURNAL es una revista científica en español sobre farmacología, de periodicidad semestral y en la que los artículos recibidos son evaluados por revisores y posteriormente aprobados por un tribunal docente. Los trabajos publicados pueden consultarse en: «eUSAL Revistas» <a href="http://revistas.usal.es/index.php/famajournal/">http://gredos.usal.es/ispui/handle/10366/4666</a>, Dialnet.

Realiza: Jáser Proyectos Editoriales - www.jasernet.com

# farmajournal

e-ISSN: [pendiente de concesión]

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2016, vol. 1, n. 1

# ÍNDICE

# ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Cristina Martín; Pedro Fernández-Soto; Antonio Muro, Valoración de la técnica SmMIT-LAMP para la selección molecular de ADN de Schistosoma mansoni en muestras de orina	25-32
Jesús Morán; Darwin A. Moreno-Pérez; Manuel A. Matarroyo; Antonio Muro, Estudio del proteoma en Malaria	33-40
Claudia Orallo Luna; Rogelio González Sarmiento, Evaluación del efecto de la cloroquina sobre la autofagia en células tumorales de mama y su posible utilidad como fármaco antineoplásico	41-51
Óscar Delgado Rubio; M.ª José de Jesús Valle; Amparo Sánchez Navarro, Diseño de una formulación de liposomas para la administración de vacunas	53-60
Laura García Jiménez; Ana María Martín Suárez, PRMs detectados en pacientes en tratamiento con digoxina en urgencias	61-72
Beatriz Gutiérrez; Juan P. Bolaños, Silenciamiento de la glucosa-6.fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en células de carcinoma de riñón humano HEK-293T, mediante la técnica del ARN de interferencia	73-83
Irene Suárez Antuña; María del Pilar Aldasoro Martín, Detección y prevención de la hipercolesterolemia en los pacientes que acuden a la oficina de farmacia atención farmacéutica	85-92
María José Sánchez Carpintero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús Valle, Caracterización y separación de liposomas por microencapsulación	93-100
Bladimir Vega; Margarita del Arco; Cristina Martín; Marcelino Zazo; Víctor Raposo, Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como matrices de liberación controlada	101-108
Beatriz Cartujo; Pilar Aldasoro, Atención farmacéutica en osteoporosis en la mujer postmenopáusica	109-117
Almudena Óvilo; Luis Félix Valero; Ramona Mateos, Evaluación de las intervenciones en salud materno-infantil en África subsahariana	119-129
Lucía Fernández; Javier Muñoz, Atención farmacéutica en DMAE (Degeneración Macular Asociada a la Edad)	131-141



# ÍNDICE

# CONFERENCIAS DE LA ACADEMIA DE FARMACIA DE CASTILLA Y LEÓN

Rosa Hernández Martín, Nanomedicina en el siglo xxi: ¿un avance contra la enfermedad?	145-146
Francisco Zaragoza García, El mundo de los biofármacos y los nuevos horizontes terapéuticos	147-148
José María Recio Pascual, Apoptosis: el suicidio celular es un proceso salu- dable para nuestra vida	149-150
Teresa M.ª Muñoz Cidad, Actualización en vacunas desde el punto de vista de la epidemiología de las enfermedades	151-152
Ana Jiménez López; Pilar Liceras Boíllos; Jonás Samuel Pérez Blanco, I mesa redonda de becarios de la Facultad de Farmacia de Salamanca	153-156
Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata, Hábitats y vegetación natural en la alta montaña del parque regional de la sierra de Gredos (Castilla y León, Ávila)	157-158
PONENCIAS FARMAFORUM	
Juan R. García Soria, Biotech development	161-162
Mar Lago Núñez, Enfermedades emergentes: la amenada del ébola	163-170
Jesús Fernández-Pérez, <i>El debate homeopático</i>	171-172
Fidel Ortega-Ortiz de Apodaca, Farmacia y universidad. Resumen intervención de Fidel Ortega en la edición Farmaforum 2015, celebrado el día 6 de mayor en Salamanca	173-174
Silvio Ragozzino, Tratamiento de la hepatitis C: situación actual y perspec- tivas futuras	175-177
Pedro F. Mateos, Alimentos transgénicos	179-180



# farmajournal

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2016, vol. 1, n. 1

# **INDEX**

# RESEARCH REPORTS

Cristina Martín; Pedro Fernández-Soto; Antonio Muro, Assessment of the SmMIT-LAMP Thecnique for the Molecular Detection of Schistosoma mansoni DNA in Urine Samples	25-32
Jesús Morán; Darwin A. Moreno-Pérez; Manuel A. Matarroyo; Antonio Muro, <i>Malaria Proteomic Research</i>	33-40
Claudia Orallo Luna; Rogelio González Sarmiento, Evaluation of Chloroquine Effect in Autophagy of Breast Cancer Cells and its Possible Use in Chemotherapy	41-51
Óscar Delgado Rubio; M.ª José de Jesús Valle; Amparo Sánchez Navarro, Design of a Liposomal Formulation Aimed to Vaccines Administration	53-60
Laura García Jiménez; Ana María Martín Suárez, DRPs Detected in Patients in Treatment with Digoxin who Were Attented in Emergency Department	61-72
Beatriz Gutiérrez; Juan P. Bolaños, Gene silencing of glucose-6-phosphate dehydrogenase in renal carcinoma cells HEK-293T, by RNA interference	73-83
Irene Suárez Antuña; María del Pilar Aldasoro Martín, Detection and Prevention of Hypercholesterolemia in Patients who Come to the Pharmacy	85-92
María José Sánchez Carpintero; Amparo Sánchez Navarro; María José de Jesús Valle, Liposomes Isolation and Characterizatin by Microencapsulation	93-100
Bladimir Vega; Margarita del Arco; Cristina Martín; Marcelino Zazo; Víctor Raposo, Magnetic Nanoparticles of Iron Oxide as Matrices from Controlled Release	101-108
Beatriz Cartujo; Pilar Aldasoro, <i>Pharmaceutical Care in Osteoporosis in Post-menopausal Women</i>	109-117
Almudena Óvilo; Luis Félix Valero; Ramona Mateos, Evaluation of Maternal and Child Health Interventions in Africa Subsaharian	119-129
Lucía Fernández; Javier Muñoz, <i>Pharmaceutical Care in ARMD (Age-Related Macular Degeneration)</i>	131-141



### INDEX

# CONFERENCES OF THE CASTILLA AND LEON PHARMACY ACADEMY

Rosa Hernández Martín, Nanomedicine in the 21st century: an advance against diseases?	145-146
Francisco Zaragoza García, The world of biodrugs and new therapeutic horizons	147-148
José María Recio Pascual, Apoptosis, cell suicide is a healthy process in our lives	149-150
Teresa M.ª Muñoz Cidad, New insights in vaccines from a disease epidemio- logic point of view	151-152
Ana Jiménez López; Pilar Liceras Boíllos; Jonás Samuel Pérez Blanco, 1st round table of Pharmacy PhD student s in Salamanca	153-156
Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata, Habitats and natural vegetation in the mountains of t Sierra de Gredos regional park (Castilla y Leon, Ávila).	157-158
PAPERS FARMAFORUM	
Juan R. García Soria, Biotech development	161-162
Mar Lago Núñez, Emerging diseases: the Ebola threat	163-170
Jesús Fernández-Pérez, Homeopathic debate	171-172
Fidel Ortega-Ortiz de Apodaca, Pharmacy and University	173-174
Silvio Ragozzino, Hepatitis C treatment: current situation and perspectives	175-177
Pedro F. Mateos, Transgenic food	179-180



# farmajournal

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2016, vol. 1, n. 1

Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0)

# ÍNDICE ANALÍTICO

Martín, Cristina; Fernández-Soto, Pedro; Muro, Antonio Valoración de la técnica SmMIT-LAMP para la selección molecular de ADN de *Schistosoma mansoni* en muestras de orina FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 25-32

RESUMEN: Antecedentes: La esquistosomosis humana es una de las enfermedades parasitarias más frecuentes en todo el mundo. Su principal problema reside en el control de la enfermedad debido a las limitaciones de las técnicas parasitológicas y serológicas. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico capaces de detectar la infección en fase aguda. Un enfoque prometedor es la técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (Loop-mediated isothermal amplification).

Metodología / Resultados: Se utilizó un modelo murino de Schistosoma mansoni para obtener muestras de orina a partir de ratones infectados con cercarias de S. mansoni. Las muestras se recogieron semanalmente desde la semana 0 hasta la semana 8ª después de la infección. Posteriormente se realizó al análisis de las muestras de orina mediante la técnica SmMIT-LAMP, consiguiendo detectar ADN de S. mansoni desde la 3ª semana post-infección (p.i).

Conclusiones / Importancia: Hemos logrado, por primera vez, la detección de ADN de S. mansoni en muestras de orina en fase aguda de la infección producida por S. mansoni mediante un método molecular sencillo, rápido, económico y potencialmente aplicable en zonas endémicas.

Palabras clave: Schistosoma mansoni; ratones; muestras de orina; diagnóstico; LAMP.

Morán, Jesús; Moreno-Pérez, Darwin A.; Patarroyo, Manuel A.; Muro, Antonio Estudio del proteoma en Malaria FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 33-40

RESUMEN: La malaria sigue siendo una de las principales enfermedades transmisibles del planeta, especialmente en áreas tropicales y subtropicales. Dentro de las diversas especies causantes de esta enfermedad, en los últimos años ha ganado relevancia el



estudio de *P. vivax* debido a sus características propias, que la hacen especialmente difícil de erradicar.

En el presente estudio, nos proponemos analizar e identificar las proteínas de la fase hemática de *P. vivax* mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS).

Los resultados del estudio nos permitieron identificar 743 proteínas, de las que 522 no habían sido previamente descritas. Además, la comparación del perfil de expresión de estas proteínas con el perfil transcripcional de *P. vivax* nos permitió corroborar lo descrito en estudios anteriores: el cambio adaptativo en el perfil transcripcional de la cepa VCG-1 de *P. vivax*.

Palabras clave: P. vivax; proteoma; espectrometría de masas; proteínas.

Orallo Luna, Claudia; González Sarmiento, Rogelio Evaluación del efecto de la cloroquina sobre la autofagia en células tumorales de mama y su posible utilidad como fármaco antineoplásico FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 41-51

RESUMEN: La autofagia es un proceso celular que se encarga de la degradación de orgánulos dañados y de la obtención de nutrientes en condiciones de ayuno. Este proceso tiene un papel muy importante en la regulación del cáncer. En fases iniciales impide el desarrollo de células tumorales; mientras que, en fases finales del cáncer, promueve las metástasis y la resistencia a la quimioterapia. Cloroquina es un fármaco antipalúdico al que, en estudios recientes, se le han atribuido propiedades antineoplásicas debido a un mecanismo de inhibición de la autofagia. El objetivo de este trabajo es comprobar, por un lado, el efecto citotóxico de la cloroquina sobre la línea celular BT-549 de cáncer de mama mediante un ensayo MTT; y por otro, estudiar el efecto de la cloroquina sobre tres proteínas autofágicas: LC3, p62 y Beclin-1 por medio de un Western Blot. Los resultados obtenidos indican que la cloroquina inhibe el crecimiento celular a 50 µM y que la cloroquina aumenta la expresión de las proteínas estudiadas, lo que se podría considerar un mecanismo compensador de la célula ante la inhibición de la autofagia producida por cloroquina. En conclusión, la cloroquina podría ser un fármaco con utilidad en el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: cloroquina; autofagia; cáncer de mama; quimioterapia.

Delgado Rubio, Óscar; JesúsValle, M.ª José de; Sánchez Navarro, Amparo Diseño de una formulación de liposomas para la administración de vacunas FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 51-58

RESUMEN: Los efectos de una vacuna dependen no solo del antígeno, sino también de factores relacionados con la formulación; la elección del sistema de liberación junto con



el empleo de potenciadores inmunológicos son aspectos de gran relevancia. Actualmente existen numerosas estrategias en desarrollo en este campo basadas en la utilización de liposomas. El objetivo de este trabajo ha sido el diseño y la preparación de un vehículo para la administración de vacunas, capaz de liberar inmediatamente el coadyuvante y más lentamente el antígeno. Analizando los conocimientos previos se realizó, en una primera fase, el diseño teórico del vehículo y seguidamente la preparación y caracterización del mismo. La «formulación propuesta» se basa en la microencapsulación de liposomas, constituidos por fosfatidilcolina, colesterol y dimetildioctadecil amonio, con albúmina bovina. El procedimiento experimental aplicado, que transcurre en ausencia de disolventes orgánicos, permite obtener liposomas con un potencial zeta de 61,9±2,08 mV y tamaño entre 20 y 70 nm así como su inclusión en partículas esféricas de albúmina, cuyo rango de tamaño resultó ser de 2-10 µm. Con estas características el vehículo no podría administrarse por vía parenteral pero si nasal o transdérmica.

Palabras clave: liposomas; vacunas; microesferas de albúmina.

García Jiménez, Laura; Martín Suárez, Ana María PRMs detectados en pacientes en tratamiento con digoxina en urgencias FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 61-72

RESUMEN: Con el objetivo de estudiar problemas relacionados con medicamentos (PRMs) asociados al tratamiento con digoxina, se realizó una revisión retrospectiva de informes de monitorización en pacientes con digoxinemias > 1.3 ng/mL que acudieron al Servicio de Urgencias entre enero- noviembre de 2012, excluyéndose aquellos con falta de información (población final: 46). Asimismo, se individualizaron las dosis mediante ajuste bayesiano (PKS®, Pharmacokinetic System, Abbott).

Los PRMs analizados incluyeron aquellos relacionados con la monitorización (13%); digoxinemias > 1.3 ng/mL en mayores de 70 años (100%); dosis > 0.125 mg diarios en pacientes insuficiencia renal (36.9%); hipopotasemia (6.5%) e hiperpotasemia (8.7%); medicación concomitante con posible interacción: 95% (dato en 19 pacientes), 89% de los cuales presentaban aumento del riesgo de intoxicación.

Tras excluir a 9 pacientes cuyas concentraciones no eran valorables por el tiempo de muestreo, se individualizó la dosis en 23 de los 37 pacientes restantes (en los otros 14 se recomendó repetir la monitorización por discordancias entre la digoxinemia real y la esperada).

A pesar de la limitada información disponible, podemos concluir que la monitorización y la individualización de dosis hubiesen evitado pautas inadecuadas en el 100% de los pacientes en los que había suficiente información para realizar un reajuste posológico.

Palabras clave: digoxina; Problemas Relacionados con Medicamentos (PRMs); anciano; monitorización.



GUTIÉRREZ, BEATRIZ; BOLAÑOS, JUAN P.

Silenciamiento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en células de carcinoma de riñón humano HEK-293T, mediante la técnica del ARN de interferencia

FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 73-83

RESUMEN: El papel de la ruta de las pentosas fosfato, así como su contribución total en la glucólisis son a día de hoy todavía una incógnita. Tras haberse descubierto recientemente una relación directa entre una sobreexpresión de dicha ruta y la proliferación de diversos tumores malignos, clarificar ambas cuestiones ha cobrado especial importancia en la lucha contra el cáncer. En este estudio se ha realizado el silenciamiento de la enzima que cataliza la primera reacción de dicha ruta, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, por medio del ARN de interferencia y utilizando como línea celular células de carcinoma de riñón humano HEK-293T. La medición de la repercusión del silenciamiento se ha realizado mediante la medida de lactato (µmol/mg de proteína)/24h, utilizándose células con el gen de la luciferasa silenciado como grupo control. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto una notoria disminución de la producción de lactato en las células con la enzima silenciada: 2.73 µmol/mg de proteína/24h en comparación con 7.81 µmol/mg de proteína/24h en el grupo control; lo que nos lleva a la conclusión de que la ruta de las pentosas fosfato contribuye de manera muy significativa en la producción de piruvato por medio de la glucólisis.

Palabras clave: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; ruta de las pentosas fosfato; glucólisis.

Suárez Antuña, Irene; Aldasoro Martín, María del Pilar Detección y prevención de la hipercolesterolemia en los pacientes que acuden a la oficina de farmacia atención farmacéutica FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 85-92

RESUMEN: Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en los países desarrollados. Entre los principales factores de riesgo se encuentra la hipercolesterolemia, aumento de los niveles de colesterol en sangre por encima de los valores considerados normales para la población en general, por su implicación en el desarrollo de aterosclerosis.

Este trabajo tiene como objetivo elaborar un plan de atención farmacéutica para orientar a los pacientes sobre las medidas higiénico-dietéticas, la detección de pacientes no diagnosticados y reforzar el cumplimiento de los tratamientos, mediante la realización de encuestas, entrega de hojas informativas y controles analíticos de colesterol total y triglicéridos.

Los resultados obtenidos evidencian que la falta de conocimiento del tratamiento es una de las principales causas de su incumplimiento y el importante papel que el farmacéutico comunitario puede desarrollar en este ámbito.

Palabras clave: hipercolesterolemia; riesgo cardiovascular; estatinas.



Sánchez Carpintero, María José; Sánchez Navarro, Amparo; de Jesús Valle, María José

Caracterización y separación de liposomas por microencapsulación FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 93-100

RESUMEN: Los liposomas son vesículas microscópicas compuestas de bicapas lipídicas concéntricas que alternan con compartimentos acuosos. Las proteínas y los lípidos son materiales biocompatibles y biodegradables utilizados para la microencapsulación de fármacos, siendo la albúmina una de las proteína de interés debido a su importante papel como un transportador.

El objetivo del estudio fue encapsular liposomas cargados con ciprofloxacino en Albusomas®, un novedoso vehículo farmacéutico basado en liposomas recubiertos de albúmina.

La preparación de las vesículas se llevó a cabo mediante el método de hidratación de lípidos y el método de sonicación, utilizando una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (EPC), dietildodecilamonio (DDA) y colesterol (Ch).

Los liposomas se encapsularon con albúmina bovina por floculación inducida. El sedimento, aislado por centrifugación contiene las microesferas formadas por los liposomas recubiertos de albúmina con ciprofloxacino en el núcleo acuoso, y en las capas de revestimiento de albúmina. Se determinó la concentración de ciprofloxacino en el sobrenadante y se comprobó la ausencia de liposomas en el mismo. El vehículo propuesto (Albusomas®) demostró ser capaz de encapsular los liposomas con una alta eficacia de encapsulación de ciprofloxacino (86,0±5,0% y 93,52±3,94%) para el método de hidratación de lípidos y el método de sonicación, respectivamente.

Palabras clave: liposomas; microencapsulación; ciprofloxacino; albúmina.

Vega, Bladimir; Arco, Margarita del; Martín, Cristina; Zazo, Marcelino; Raposo, Víctor

Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como matrices de liberación controlada

FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 101-108

RESUMEN: En este trabajo se ha llevado a cabo la preparación de magnetitas por distintos métodos, coprecipitación y solvotermal, y su posterior recubrimiento con sílice mesoporosa. Asimismo, se han caracterizado utilizando diferentes técnicas: DRX, FT-IR, Adsorción-desorción de  $\rm N_2$  a -196 °C, curvas de magnetización y SEM. Los resultados obtenidos indican que es el método solvotermal el que permite obtener nanopartículas homogéneas, de pequeño tamaño, con morfología esférica y mayor magnetismo, propiedades que las hace idóneas para ser utilizadas como matrices de liberación controlada.

Palabras clave: Magnéticas; nanopartículas; sílice mesoporosa.



Cartujo, Beatriz; Aldasoro, Pilar Atención farmacéutica en osteoporosis en la mujer postmenopáusica FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 109-117

RESUMEN: *Introducción*: La osteoporosis es un importante problema de salud pública, que afecta mayoritariamente a la población femenina. Se trata de una enfermedad caracterizada por una disminución de la masa ósea y la modificación de microarquitectura del tejido óseo, que conduce al aumento de la fragilidad ósea y del riesgo de fracturas.

Métodos y objetivos: Se realizó un cuestionario a 22 mujeres postmenopáusicas que acudían a retirar sus medicamentos para osteoporosis en la oficina de farmacia durante cuatro meses. Los objetivos del trabajo fueron conocer la incidencia de factores de riesgo e identificar los medicamentos más utilizados, grado de adherencia al tratamiento y efectos adversos más frecuentes. Con el análisis de estos datos, determinar la actuación del farmacéutico.

Conclusiones: En este estudio, se observó que los fármacos más utilizados fueron los bifosfonatos, la adherencia al tratamiento fue buena y la incidencia de efectos adversos baja. El farmacéutico tiene un papel primordial en mejorar el conocimiento del paciente sobre el tratamiento y su enfermedad, prevenir posibles complicaciones, optimizar la adherencia al tratamiento y ofrecer educación sanitaria para promover hábitos de vida saludables.

Palabras clave: osteoporosis postmenopáusica; factores de riesgo; tratamiento; bifosfonatos.

Óvilo, Almudena; Valero, Luis Félix; Mateos; Ramona Evaluación de las intervenciones en salud materno-infantil en África subsahariana FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 119-129

RESUMEN: La salud de las mujeres y los niños en países en vías de desarrollo está seriamente vulnerada. En la cumbre de las Naciones Unidas del año 2000 se fijaron objetivos específicos para mejorarla. Las intervenciones en Salud Materno-Infantil en África

seriamente vulnerada. En la cumbre de las Naciones Unidas del ano 2000 se fijaron objetivos específicos para mejorarla. Las intervenciones en Salud Materno-Infantil en África Subsahariana que se han llevado a cabo desde entonces son numerosas. No todas ellas han tenido los resultados deseados. Es importante analizar su efectividad en el terreno para perfilar los planes de acción y por tanto progresar en de salud universal y de calidad en los entornos más deficitarios.

Palabras clave: Intervención; Salud; Maternidad; Niño; África.



Fernández, Lucía; Muñoz, Javier

Atención farmacéutica en DMAE (Degeneración Macular Asociada a la Edad)

FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 131-141

RESUMEN: La Degeneración Macular Asociada a la Edad es una maculopatía que actualmente supone la principal causa de pérdida visual irreversible en el mundo occidental. Se trata de un proceso degenerativo que afecta a varias estructuras oculares como la membrana de Brunch, el epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores de la mácula. El único factor de riesgo universalmente aceptado para esta patología es la edad, aunque diversos estudios apuntan a una posible relación con otros factores de riesgo. Su detección no es sencilla debido al desconocimiento de la población respecto a esta patología y a la facilidad para confundir sus síntomas con los de otras patologías oculares. En este trabajo se ha realizado un estudio de detección de DMAE sobre una muestra de la población con los objetivos de estimar su incidencia y relacionarla con determinados factores de riesgo. Para ello se ha realizado previamente una revisión bibliográfica sobre el tema y se ha utilizado material como encuestas, rejillas de Amsler y folletos informativos. En los resultados cabe destacar la elevada prevalencia de los factores de riesgo posiblemente relacionados en la muestra utilizada. Además, se detectó un caso de DMAE, de modo que el estudio ha contribuido a la mejora de la calidad de vida de un paciente.

Palabras clave: DMAE; mácula; rejilla de Amsler.



# farmajournal

CDU: 615 - IBIC: Farmacología (MMG) - BIC: Pharmacology (MMG); BISAC: Medical / Pharmacology (MED071000)

2016, vol. 1, n. 1

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

# ANALYTIC SUMMARY

Martín, Cristina; Fernández-Soto, Pedro; Muro, Antonio Assessment of the SmMIT-LAMP Technique for the Molecular Detection of Schistosoma mansoni DNA in Urine Samples FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 25-32

ABSTRACT: *Background:* Human schistosomiasis, is one of the most common parasitic diseases worldwide. Parasitological and serological techniques have different shortcomings to control this illness. Therefore, the development of new diagnostic methods to detect infection in acute phase is required. Loop-mediated isothermal amplification technique (LAMP) could be a good choice.

Methodology / Results: Firstly, experimental model was used to obtain urine samples from mice infected with cercariae of S. mansoni. The samples were collected weekly from week 0 to 8th post-infection. Finally, SmMIT-LAMP technique was performed to analyse urine samples DNA of S. mansoni was detected since 3rd week post-infection.

Conclusions / Significance: We have detected, for the first time in acute phase, DNA of the S. mansoni in urine samples of infected mice, using a simple, rapid, inexpensive, and potentially applicable method to the diagnosis of schistosomiasis in endemic areas.

Key words: Schistosoma mansoni; Mice; Urine samples; Diagnosis; LAMP.

Morán, Jesús; Moreo-Pérez, Darwin A.; Patarroyo, Manuel A.; Muro, Antonio Malaria Proteomic Research

FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 33-40

ABSTRACT: Malaria is one of the main infectious diseases in the world, particularly in tropical and subtropical areas. Among the species that can cause this disease, in recent years *P. vivax* has been growing due to its own attributes, which make it highly difficult to eradicate.

This study was focused on analyzing and identifying the proteome of *P. vivax* during the blood stage through a mass spectrometry analysis (LC-MS-MS).



Results allowed us to identify 743 proteins, of which 522 never had been described before. Furthermore, the comparison of the expression of these proteins with *P. vivax* transcriptional profile allowed us to corroborate the adaptive change in the *P. vivax* VCG-1 strain transcriptome, previously described.

Key words: P. vivax; Proteome; Mass spectrometry; Proteins.

Orallo Luna, Claudia; González Sarmiento, Rogelio Evaluation of Chloroquine Effect in Autophagy of Breast Cancer Cells and its Possible Use in Chemotherapy FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 41-51

ABSTRACT: Autophagy is a celular mechanism which is in charge of destroying damaged organelles and obtaining nutrients in fasting periods. This process has a very important role in cancer regulation. In early stages of cancer, autophagy prevents the growth of tumoral cells. However, in final stages, it promotes metastasis and resistance to chemotherapy. Chloroquine is an antipaludic drug which, according to recent research, might have antineoplasic properties due to inhibition of autophagy. The target of this research is to prove, in one hand, the citotoxic effect of chloroquine in a breast cancer cell line (BT-549) by performing a MTT assay; and, in the other hand, to study the effect of chloroquine in the expression of three autophagic proteins (LC3, p62 and Beclin-1) using a Western Blot. The results indicate that chloroquine inhibites the growth of tumoral cells at 50  $\mu M$  and that chloroquine increases the expression of the proteins, which could indicate that chloroquine is inhibiting autophagy. In conclusion, chloroquine might be, in the future, a useful drug in breast cancer chemotherapy.

Key words: Chloroquine; Autophagy; Breast cancer; Chemotherapy.

Delgado Rubio, Óscar; JesúsValle, M.ª José de; Sánchez Navarro, Amparo Design of a Liposomal Formulation Aimed to Vaccines Administration FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 53-60

ABSTRACT: Antigen is not the single component involved in the pharmacological response for vaccines but additional factors such as formulation and adjuvant compounds play a relevant role. Several strategies based on the use of liposomes are currently assayed in this field. According to this, the aim of the present work was the design, preparation and characterization of a pharmaceutical vehicle able to produce a rapid delivery of adjuvants and a slow release of antigen. From the *know-how* a theoretical vehicle was design and proposed as optimal formulation and this was then prepared and characterized. The «proposed formulation» is based on albumin coated liposomes made of egg phosphatidylcholine, cholesterol and diethyldodeccyiamonium. The applied procedure carried out



#### ANALYTIC SUMMARY

in absence of organic solvents allowed for obtaining liposomes with a 20-70 nm aerodynamic diameter range and a zeta potential mean value of  $61.9\pm2.08$  mV and also for its coating with albumin. Coated particles showed a spherical shape and a size range of 2-10  $\mu$ m which does not fulfil parenteral formulations requirements but are optimal for nasal or dermatological administration routes.

Key words: Liposomes; Vaccines formulation; Albumin microspheres.

GARCÍA JIMÉNEZ, LAURA, MARTÍN SUÁREZ, ANA MARÍA DRPs DETECTED IN PATIENTS IN TREATMENT WITH DIGOXIN WHO WERE ATTENTED IN EMERGENCY DEPARTMENT FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 61-72

ABSTRACT: Aiming to study drugs related problems (DRPs) associated with digoxin treatment, a retrospective revision of monitoring reports in patients whose digoxin level was over 1.3 ng/mL and who visited Emergency Department between January-November 2012 was done, excluding those which didn't have enough information (final population: 46). Also, doses were individualized by Bayesian approach (PKS®, Pharmacokinetic System, Abbott).

DRPs which were analyzed included those related with monitoring (13%); digoxin levels > 1.3 ng/mL in patients who were elder than 70 years old (100%); doses > 0.125 mg daily in patients with renal failure (36.9%); hypokalemia (6.5%) and hyperkalemia (8.7%); possible interactions with other drugs (95% of 19 patients with information about it), 89% of whom had an increment of the intoxication risk.

After excluding 9 patients whose concentrations weren't taken at the right sampling time, posology was individualized in 23 of the 37 final patients (in the other 14 to repeat the monitoring was recommended because differences between real and expected digoxin level).

Despite of the limited information, we can conclude that monitoring and dose individualization could have avoided inadequate regimens in 100% of patients in who we had enough information for the readjustment.

Key words: Digoxin; Drug-related problems (DRPs); Elder; Monitoring.

Gutiérrez, Beatriz; Bolaños, Juan P. Gene Silencing of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Renal Carcinoma Cells HEK-293T, by RNA Interference FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 73-83

ABSTRACT: The role of pentose-phosphate pathway and its involvement in glycolysis is nowadays still unknown. Recent findings have shown a direct relationship between the over-expression of this pathway and the uncontrolled proliferation of differents malign



tumours. Clarifying the the importance of this pathway has therefore become an important key in the fight against cancer. This study has silenced the gene of the enzyme which catalyses the first reaction of this pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase, by RNA interference in human renal carcinoma cells HEK-293T. The effect of silencing this gene was controlled by measuring lactate (µmol/mg protein)/24h, using cells with the luciferase gen silenced as the control group. The results from this study show an important decrease in the production of lactate in cells with the silenced enzyme: 2,73 µmol/mg protein/24h compared to 7,81 µmol/mg protein/24h in the control group. This decrease clearly shows how the pentose-phosphate pathway highly contributes to the production of pyruvate through the glycolysis.

Key words: Pentose-phosphate pathway; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Glycolysis.

Suárez Antuña, Irene; Aldasoro Martín, María del Pilar Detection and Prevention of Hypercholesterolemia in Patients who Come to the Pharmacy

FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 85-92

ABSTRACT: Cardiovascular diseases are the first cause of death in developed countries. Among the main risk is hypercholesterolemia, increased blood cholesterol levels above normal values for the general population, for their involvement in the development of atherosclerosis.

The objective of this work was to develop a pharmaceutical care plan to guide patients about lifestyle changes, detection of undiagnosed patients and reinforce compliance with treatment through surveys, delivery of newsletters and making controls analytical total cholesterol and triglycerides.

The results show that the lack of knowledge of treatment is one of the main causes of the breach and the important role the community pharmacist can develop in this area.

Key words: Hypercholesterolemia; Cardiovascular risk; Statins.

Sánchez Carpintero, María José; Sánchez Navarro, Amparo; de Jesús Valle, María José

Liposomes Isolation and Characterizatin by Microencapsulation FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 93-100

ABSTRACT: Liposomes are microscopic vesicles composed of concentric lipid bilayers entrapping aqueous compartments. Proteins and lipids are among biocompatible and biodegradable materials used for microencapsulation, being albumin an interesting protein due to its role as a drugs carrier.

The aim of the study was to encapsulate ciprofloxacin loaded liposomes into Albusomes® a novel pharmaceutical vehicle based on albumin coated liposomes.



The vesicle preparation was carried out using the lipid hydration method and sonication method using a mixture of egg phosphatidylcholine (EPC), diethyldodeccyiamonium (DDA) and cholesterol (Ch).

The liposomes were encapsulated with bovine serum albumin by induced flocculation. The pellet, containing the albumin coated liposomes with ciprofloxacin trapped into water vesicle core and albumin coating layers, was isolated by centrifugation. Concentration of ciprofloxacin was quantified in the supernatant and the absence of lipid vesicles was confirmed. The proposed vehicle (Albusomes®) showed to be able to encapsulate liposomes with a high drug entrapment efficacy (86.0±5.0% and 93.52±3.94%). for lipid hydration method and sonication method, respectively.

Key words: Liposomes; Microencapsulation; Ciprofloxacin; Albumin.

Vega, Bladimir; Arco, Margarita del; Martín, Cristina; Zazo, Marcelino; Raposo, Víctor

Magnetic Nanoparticles of Iron Oxide as Matrices from Controlled Release FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 101-108

ABSTRACT: In this paper is carried out preparation of magnetites by different methods, co-precipitation and solvothermal, and its subsequent coating with mesoporous silica. Also, have been characterized using various characterization techniques: XRD, FT-IR, adsorption-desorption of  $N_2$  at -196 °C, SEM and magnetization curves. The results obtained indicate that the best method is the solvothermal since it allows to obtain uniform nanoparticles, small size with spherical morphology and more magnetism, which makes them suitable to be used as matrice of controlled release.

Key words: Magnetic; Nanoparticles; Mesoporous silica.

Cartujo, Beatriz; Aldasoro, Pilar Pharmaceutical Care in Osteoporosis in Post-menopausal Women FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 109-117

ABSTRACT: *Introduction*: Osteoporosis is considered to be a serious public health issue that affects the majority of the female population. Osteoporosis is a disease characterized by the reduction of bone mass and the modification of the bone structure, leading to enhanced bone fragility and an increased susceptibility to fracturing.

Methods and objectives: A questionnaire was administered to 22 postmenopausal women who used the pharmacy to collect their osteoporosis drugs over a period of four months. The objectives were to determine the incidence of risk factors and to identify the drugs used, adherence to treatment and adverse effects. The analysis of this data will then determine the pharmacutical action



#### ANALYTIC SUMMARY

Conclusions: In this study, it was observed that the most common drugs were bisphosphonates; that adherence was good and that there was a low incidence of adverse effects. The pharmacist has a major role in improving patient knowledge of treatment and disease, preventing complications, optimizing adherence and recommending healthy lifestyle habits.

Key words: Osteoporosis postmenopausal; Risk factors; Treatment; Bisphosphonates.

Óvilo, Almudena; Valero, Luis Félix; Mateos; Ramona Evaluation of Maternal and Child Health Interventions in Africa Subsaharian FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 119-129

ABSTRACT: The health of woman and children in developing countries is seriously violated. Specifc targets were set in 2000 at the United Nations Summit to improve it. Numerous interventions in maternal and child health in Sub-Saharan Africa have been implemented since. Not all of them have had the desired results. It is important to evaluate its effectiveness in the field to outline action plans, and therefore progress towars universal and quality health care in the most precarious environments.

Key words: Intervention; Health; Maternal; Child; Africa.

Fernández, Lucía; Muñoz, Javier Pharmaceutical Care in ARMD (Age-Related Macular Degeneration) FarmaJournal, 2016, vol. 1, núm. 1, pp. 131-141

ABSTRACT: Age related macular degeneration is a maculopathy that nowadays represents the main cause for the irreversible loss of eyesight in the occidental world. It is a degenerative process that affects several ocular structures as Brunch's membrane, the retinal pigment epithelium and the macula photoreceptors. There is only one risk that is worldwide accepted that is the age. Even though different studies indicate a possible relation with other risk factors. The detention is not easy because of the unawareness of the population, as well as the facility to mix up the symptoms with the ones characteristic of other ocular pathologies. This paper shows a study about the detection of age related macular degeneration in a population sample with the aims of estimating the incidence and trying to link it with other risky factors. For this purposes, a previous bibliography review about the topic has been made and different materials have been used such as surveys, Amsler's charts and information pamphlets. In the results, it is important to highlight the high prevalence of the risky factors, possibly related to the sample used. Furthermore, a case of ARMD was detected, so that this study has contributed to the improvement of the life quality of a patient.

Key words: ARMD; Macula; Amsler grind.



# Artículos de investigación

# SILENCIAMIENTO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHI-DROGENASA (G6PDH) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE RIÑÓN HUMANO HEK-293T, MEDIANTE LA TÉCNICA DEL ARN DE INTERFERENCIA

Gene silencing of glucose-6-phosphate dehydrogenase in renal carcinoma cells HEK -293T, by RNA interference

Beatriz GUTIÉRREZ

Juan P. BOLAÑOS

Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG). Universidad de Salamanca – CSIC, Zacarías González 2, 37007 Salamanca (España) Teléfono: (+34) 923 294 907 (extensión 5467)

Correo-e: bgutierrezeugenio@gmail.com

Correo-e: jbolanos@usal.es

RESUMEN: El papel de la ruta de las pentosas fosfato, así como su contribución total en la glucólisis son a día de hoy todavía una incógnita. Tras haberse descubierto recientemente una relación directa entre una sobre-expresión de dicha ruta y la proliferación de diversos tumores malignos, clarificar ambas cuestiones ha cobrado especial importancia en la lucha contra el cáncer. En este estudio se ha realizado el silenciamiento de la enzima que cataliza la primera reacción de dicha ruta, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, por medio del ARN de interferencia y utilizando como línea celular células de carcinoma de riñón humano HEK-293T. La medición de la repercusión del silenciamiento se ha realizado mediante la medida de lactato (µmol/mg de proteína)/24h, utilizándose células con el gen de la luciferasa silenciado como grupo control. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto una notoria disminución de la producción de lactato en las células con la enzima silenciada: 2.73 µmol/mg de proteína/24h en comparación con 7.81 µmol/mg de proteína/24h en el grupo control; lo que

nos lleva a la conclusión de que la ruta de las pentosas fosfato contribuye de manera muy significativa en la producción de piruvato por medio de la glucólisis.

Palabras clave: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; ruta de las pentosas fosfato; glucólisis.

ABSTRACT: The role of pentose-phosphate pathway and its involvement in glycolysis is nowadays still unknown. Recent findings have shown a direct relationship between the over-expression of this pathway and the uncontrolled proliferation of differents malign tumours. Clarifying the the importance of this pathway has therefore become an important key in the fight against cancer. This study has silenced the gene of the enzyme which catalyses the first reaction of this pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase, by RNA interference in human renal carcinoma cells HEK-293T. The effect of silencing this gene was controlled by measuring lactate (µmol/mg protein)/24h, using cells with the luciferase gen silenced as the control group. The results from this study show an important decrease in the production of lactate in cells with the silenced enzyme: 2,73 µmol/mg protein/24h compared to 7,81 µmol/mg protein/24h in the control group. This decrease clearly shows how the pentose-phosphate pathway highly contributes to the production of pyruvate through the glycolysis.

Key words: Pentose-phosphate pathway; glucose-6-phosphate dehydrogenase; glycolysis.

#### Introducción

La glucosa es considerada la principal fuente de energía de la célula. La glucosa se oxida mayoritariamente por la vía de la glucólisis generando piruvato, que entra en el ciclo del ácido cítrico produciendo en último término ATP. La glucosa puede también almacenarse en forma de otras moléculas como glucógeno; así como sufrir una oxidación por la vía de la ruta de las pentosas fosfato generando NADPH de carácter reductor y ribosa-5-fosfato, precursor de nucleótidos, coenzimas y ácidos nucleicos.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la enzima encargada de catalizar la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato y tiene acción reductora al convertir NADP+ en NADPH.

Debido a la producción de NADPH, esencial en la detoxificación celular, y de ribosa-5-fosfato, precursor esencial de ácidos nucleicos; la ruta de las pentosas

#### BEATRIZ GUTIÉRREZ Y JUAN P. BOLAÑOS ENCIAMIENTO DE LA GLUCOSA-6-FOSPATO DESHIDROGENASA (GAPDH) EN CÉLUI AS D

SILENCIAMIENTO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE RIÑÓN HUMANO HEK-293T, MEDIANTE LA TÉCNICA DEL ARN DE INTERFERENCIA

fosfato desarrolla un papel crítico en la regulación del crecimiento en células cancerígenas, habiéndose encontrado relación directa entre altos niveles de la G6PDH y diversos cánceres.

La ruta de las pentosas fosfato se divide en dos fases, la primera es la fase oxidativa que convierte la glucosa-6-fosfato en CO<sub>2</sub>, ribulosa-5-fosfato y NADPH. Durante la segunda fase o fase no oxidativa, tras una secuencia de diferentes reacciones, se produce gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, que pueden «reciclarse» y entrar de nuevo en la glucólisis.

La verdadera contribución de la ruta de las pentosas fosfato en la glucólisis es todavía una incógnita y el objetivo de este trabajo de fin de grado será contribuir a elucidar en la medida de lo posible su importancia.

# **OBJETIVOS**

Construcción de un plásmido capaz de producir el silenciamiento de la enzima Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

El objetivo final será la comparación del piruvato (medido en µmol lactato) obtenido en nuestras células con el obtenido en las células control; con el fin de analizar en futuros estudios la repercusión del silenciamiento de dicha enzima.

#### Materiales y métodos

La técnica utilizada será el ARN de interferencia.

Este mecanismo se basa en suprimir la expresión de un gen mediante la introducción de un plásmido con una secuencia nucleotídica específica. Este plásmido da lugar a un ARN de doble cadena pequeño que provoca a término la degradación del ARNm que codifica para nuestra proteína y la supresión de la traducción.

La primera fase del trabajo será crear el plásmido capaz de silenciar a la G6PDH, y la segunda fase será realizar la transfección en células HEK 293T para posteriormente medir el lactato y compararlo con las células control.

# FASE 1- BIOLOGÍA MOLECULAR

# Amplificación y purificación de plásmido pSUPER-Neo-GFP

Se utilizarán bacterias de la cepa *Escherichia coli* DH 5x con el plásmido pSUPER-Neo-GFP. Este plásmido cuenta con la región «Neo», gracias a la cual el plásmido tiene resistencia a la ampicilina; y la región «EGFP», lugar del gen de marcaje que al transfectar las células eucarióticas dará lugar a la expresión

# BEATRIZ GUTIÉRREZ Y JUAN P. BOLAÑOS

SILENCIAMIENTO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE RIÑÓN HUMANO HEK-293T, MEDIANTE LA TÉCNICA DEL ARN DE INTERFERENCIA

de una proteína verde fluorescente que facilitará comprobar la efectividad de la transfección.

Se añade al medio el antibiótico ampicilina, asegurando de esta manera el crecimiento de las bacterias que hayan incorporado el plásmido y por tanto expresado el gen de resistencia a dicho antibiótico.

Inoculación de las bacterias con un asa de platino al medio 2YT + Ampicilina, incubación durante una noche en agitación a 37°C.

Traspasadas 24h se realiza la extracción y purificación del ADN mediante el protocolo Midiprep® (kit wizard). A continuación se realiza la medida de la concentración de nuestro plásmido con espectrofotómetro (NanoDrop®): 1.6 µg/mL.

# Análisis de restricción

Se realizará un análisis de restricción para confirmar que se ha amplificado el plásmido correcto. Este análisis consistirá en someter al plásmido a digestión con unas enzimas denominadas «enzimas de restricción» que reconocen una secuencia característica de nucleótidos y cortan el ADN en ese punto exacto. Se generarán fragmentos de tamaños característicos que se podrán reconocer gracias a la posterior electroforesis. Si los fragmentos son de los tamaños esperados, se confirmará la amplificación del plásmido correcto.

La elección de las enzimas (PstI y PvuII) ha sido en base a que generan fragmentos de tamaños muy diferentes que permitirán diferenciarlos fácilmente en la posterior electroforesis.

Tras realizar la digestión (37°C, 1h), se procederá a la electroforesis. Para ello se preparará también una solución-marcador (tampón de carga, H<sub>2</sub>O y marcador 1 kB *DNA ladder*) que se introducirá a ambos lados de las muestras de plásmidos.

# Preparación del gel de agarosa

Agarosa al 0.8% y TAE (tris-acetato de EDTA), someter a alta temperatura hasta disolución completa de la agarosa.

Añadir MidoriGreen® y colocarlo en la placa de electroforesis junto con los peines que al solidificar la disolución formarán los pocillos en los que se colocarán las muestras. Cargar los pocillos con las muestras y esperar 1h30min a que la electroforesis se realice.

Los resultados del análisis nos confirman la amplificación del plásmido correcto.

# Linealización del plásmido

Digestión del plásmido con las enzimas HindIII y BglII.

- Mezcla de los reactivos:
  - H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, ADN, buffer tango, enzima *Bgl*II y enzima *Hind*III.
- Incubación a 37°C durante 2h.

Para linealizar el plásmido se han elegido enzimas de un mismo polylinker (pequeño segmento de ADN que contiene numerosos lugares de reconocimiento de diferentes enzimas de restricción). Esta vez el objetivo es digerir el plásmido por dos lugares que estén muy próximos, para introducir en ese pequeño fragmento de ADN que estamos cortando los oligos específicos que silenciarán la G6PDH.

# Desfosforilación

- Mezcla de reactivos: Dephosphorylation buffer, alkaline phosphate, H<sub>2</sub>0
  libre de nucleasas.
- Incubación 15' a 37°C, después incubación 10' a 75°C.

# Electroforesis

Agarosa Sigma® 0,8%, TAE. 60 voltios.

Tras la electroforesis, con una espátula recortar el fragmento de gel en el que está nuestro plásmido, recogerlo en un eppendorf y realizar la purificación del ADN.

# Purificación del plásmido

Se realiza la purificación del plásmido (cantidad de plásmido obtenida del gel: 702 mg), y a continuación se guarda el ADN purificado a –20°C, no sin antes medir la concentración del plásmido (7.66 µg/µl).

# Ligación de los oligos con el plásmido

Anillamiento de los oligos, fosforilación de los oligos y ligamiento en pSUPER.

© Ediciones Universidad de Salamanca / @@@@@ FarmaJournal, vol. 1, núm. 1 (2016), pp. 73-83

# Transformación de las bacterias

La transformación es el término con el que nos referimos a la entrada del material genético exógeno del plásmido en la bacteria.

### • Procedimiento:

- Baño de hielo seco (CO<sub>2</sub>) y etanol de las células competentes
- Añadir el plásmido, someter a 42°C, 45", hielo 2'
- Añadir medio LB, agitación 37°C, 225 rpm 1h
- Siembra con el asa de platino en placas con medio LB + ampicilina.
  Invertir la placa e incubar toda la noche a 37°C.

# Comprobación de placas

Al comprobar las placas se aprecian colonias grandes (las deseadas) y colonias más pequeñas. Estas últimas puede que sean de otras bacterias no deseadas; esto puede ser debido a que la ampicilina estuviera algo degradada y haya habido bacterias que hayan adaptado su metabolismo y hayan desarrollado cierta resistencia. Se eligen las colonias más grandes y más alejadas de las colonias pequeñas, en total seleccionamos 8 colonias.

# • Amplificación

Siembra de las 8 colonias en un eppendorf con medio LB y ampicilina. Incubación toda la noche a 37°C en agitación.

EXTRACCIÓN DEL ADN de las bacterias mediante el procedimiento MidiPrep® y posterior <u>purificación</u>. Se medirá también la concentración de ADN de cada una de mis colonias.

### Análisis de restricción

Esta vez el análisis de restricción se realizará con las enzimas de restricción *Eco*R1 y *Hind*III y las 8 colonias. Tras realizar la electroforesis, se selecciona la colonia 5 como colonia principal.

# Amplificación

Se realizará una amplificación de la colonia 5, a continuación se extraerá el ADN y se purificará.

Se medirá la concentración del plásmido (2272,85 ng/µl) y a continuación se procederá a su congelación.

© Ediciones Universidad de Salamanca / @@@@@ FarmaJournal, vol. 1, núm. 1 (2016), pp. 73-83

## Análisis de restricción

Se realizará un último análisis de restricción antes de proceder al cultivo de células para confirmar que el plásmido amplificado es el deseado.

Agarosa al 3% y *DNA ladder* de 100 pb (para diferenciar mejor las bandas). Se utilizarán *Eco*R1 y *Hind*III como en el anterior análisis de restricción.

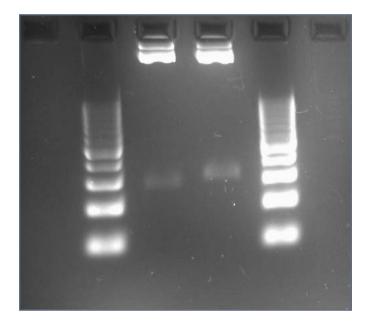


FIGURA 1. En esta imagen se observa claramente la diferencia de bandas respecto al plásmido original y al plásmido que hemos construido. La diferencia de bandas se debe a que nuestro plásmido construido debería haber incorporado nuestros oligos, siendo por tanto de mayor peso molecular y desplazándose más lentamente por el gel de agarosa: visualización de la banda en una zona superior. Esta electroforesis nos confirma la construcción del plásmido, y nos permite continuar hacia la segunda fase del experimento.

# FASE 2 - CULTIVOS CELULARES

Las células de carcinoma de riñón humano HEK-293T serán la línea celular utilizada. Estas células cuentan con un rápido crecimiento y fácil mantenimiento, así como con un % muy alto de eficiencia de transfección, razón por la cual se elegirán para el experimento.

© Ediciones Universidad de Salamanca / @@@@@ FarmaJournal, vol. 1, núm. 1 (2016), pp. 73-83

Se realizará el cultivo de células 293T humanas durante 3 semanas. El procedimiento a seguir será siempre el mismo, realizándose cada 48 horas y utilizando como reactivos PBS, tripsina, suero fetal y medio DMEM.

# Transfección de las células HEK 293T

El término transfección se refiere a la introducción de ácidos nucleicos en células eucarióticas mediante un método que no sea relacionado con virus. El gran problema que se plantea a la hora de realizar una transfección es que se debe introducir ADN, cargado negativamente, en células con una membrana cargada también negativamente. Para ello, se utilizará el PEI (polietilenimina), un polímero sintético catiónico que opsoniza el ADN y permite la entrada en la célula, al interactuar sus cargas positivas con las negativas del ADN.

Se pasarán las células a 6 placas de 20 cm<sup>2</sup> y se añadirá el reactivo polilisina. De las 6 placas, 3 de ellas se transfectarán con un plásmido que silencia el gen de la luciferasa, y se utilizarán como control; las otras 3 se transfectarán con el plásmido que silencia el gen de la G6PDH.

El gen de la luciferasa es un gen que no se expresa en las células humanas, por lo que su silenciamiento no tendrá repercusiones fisiológicas en nuestras células.

# Procedimiento:

- Mezcla de 1.5mL de mezcla ADN + OPTIMEM con 1.5mL de mezcla de PEI + OPTIMEM. Vórtex e incubación 10° a RT.
- Lavado de las células con PBS (2x).
- Añadir 1mL de la mezcla ADN-PEI a cada placa con células.
- Añadir a cada placa 1.5mL de medio OPTIMEM. Agitación suave e incubación en estufa (1h).
- Reemplazar la mezcla de transfección con medio de cultivo (DMEM + 10% SF).

# Determinación de L(+)-lactato:

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato a lactato, consumiéndose NADH y formándose NAD+. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de aparición del NADH, medido a 340 nm. El tampón (conteniendo hidracina) desplaza la reacción, debido a que la hidracina secuestra el piruvato y por la ley de masas la reacción se favorece.

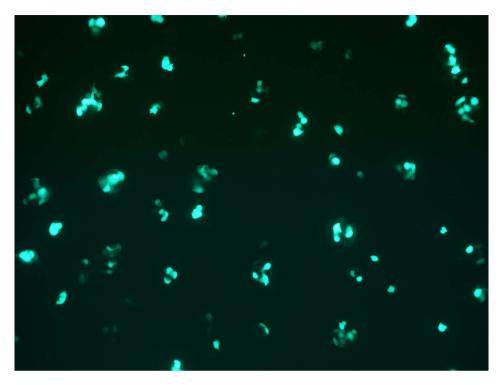


FIGURA 2. Aspecto de las células 293T transfectadas al microscopio de fluorescencia. Se observa que la transfección ha sido correcta y que las células 293T han expresado el plásmido deseado, ya que si no no habrían desarrollado la fluorescencia.

# Procedimiento:

Mezcla enzimática: 6 mL tampón (glicina-hidracina- EDTA (0.5M-1M-2mM), pH ajustado hasta 9.5 y agua), 6 mg NAD+, 40 μL LDH.

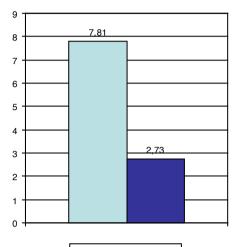
Antes de proceder a la determinación del lactato se realiza una desproteinización con el fin de precipitar las proteínas y que de esta manera no interfieran en la medida:

- Ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) al 2%, neutralización con KOH y vórtex.

En cada pocillo se añadirán 150  $\mu L$  de mezcla enzimática, 120  $\mu L$  de agua y 30  $\mu L$  de muestra.

Leer absorbancia a 340 nm a tiempo 0 y después de 40-60'.

#### RESULTADOS



□ Control ■ sh-G6PDH

	ABS.	Авѕ-В	Lac (µmol/ml)/24H	Lac (µmol/mg)/24H		SEM
Controles	2,73	2,05	3,290	10,66		
	2,68	2,00	3,215	10,41		
	2,13	1,45	2,332	7,55	7,81	0,09
	2,19	1,51	2,424	7,85		
	2,18	1,50	2,417	7,83		
	2,21	1,53	2,467	7,99		
sh-G6PDH	0,83	0,15	0,245	0,79		
	0,80	0,12	0,197	0,64		
	1,29	0,61	0,986	3,19	2,73	0,21
	1,25	0,57	0,924	2,99		
	1,14	0,46	0,740	2,40		
	1,13	0,45	0,719	2,33		

FIGURA 3. Absorbancias y producción de lactato en las células controles y en las células en las que se ha producido el silenciamiento de la G6PDH. Se han realizado 2 medidas de cada placa, por lo que de 6 placas se han obtenido 12 mediciones. Se han descartado los valores de la primera placa control y de la primera placa sh-G6PDH; ya que claramente han sufrido algún error de manipulación.

### BEATRIZ GUTIÉRREZ Y JUAN P. BOLAÑOS

SILENCIAMIENTO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE RIÑÓN HUMANO HEK-293T, MEDIANTE LA TÉCNICA DEL ARN DE INTERFERENCIA

Tras la medida de lactato, se observa de manera muy clara que la producción de lactato de las células transfectadas con el plásmido shG6PDH es notoriamente menor que las células control; lo que es signo de que el plásmido pSuper-neo-GFP ha silenciado efectivamente la enzima G6PDH.

### Discusión y conclusiones

Esta reducción de la producción de lactato en las células con la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa silenciada sugiere que la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y la ruta de las pentosas fosfato contribuyen de manera significativa a la producción de piruvato por medio de la glucólisis.

Esta hipótesis será objeto de posteriores investigaciones que comenzarán próximamente en el Instituto de Biología Funcional y Genómica de Salamanca.

#### BIBLIOGRAFÍA

- AKINC, A., THOMAS, M., KLIBANOV, A. M. y LANGER, R.: Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. J Gene Med. 2004; 7(5): 657-663.
- BOUZIER-SORE, A. K. y BOLAÑOS, J. P.: Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging. Front in Aging Neurosci. 2015; 19(7):89.
- Dallas, A.y Vlassov, A. V.: RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. Med Sci Monit. 2006; 12(4): RA67-74.
- JIANG, P., Du, W. y Wu, M.: Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. Protein Cell. 2014; 5(8):592-602.
- KLETZIEN, R. F., HARRIS, P. K. y FOELLMI, L. A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a «housekeeping» enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. FASEB J. 1994; 8(2):174-81.
- NELSON, D. y Cox, M.: Principios de bioquímica Lehninger. 4ª ed. Barcelona: Omega; 1995. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P., FERNÁNDEZ, E. y BOLAÑOS, J. P.: Underestimation of the
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P., FERNANDEZ, E. y BOLANOS, J. P.: Underestimation of the pentose-phosphate pathway in intact primary neurons as revealed by metabolic flux analysis. J Cereb Blood Flow Metab. 2013; 33(12):1843-5.
- Rudolph, C., Lausier, J., Naundorf, S., Müller, R. H. y Rosenecker, J.: In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. J Gene Med. 2000; 2(4): 269-78.
- SEN, G. L. y BLAU, H. M.: A brief history of RNAi: the silence of the genes. Faseb J. 2006; 20(9):1293-9.
- STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., WAMELINK, M. M., CAMPBELL, K., CHEUNG, E. *et al.*: The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. Biol Rev Camb Philos Soc. 2014; 90(3):927-963.
- THOMAS, P. y SMART, T. G.: HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J Pharmacol Toxicol Methods. 2005; 51(3):187-200.

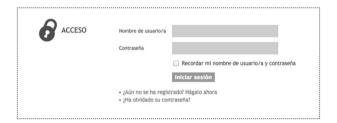
## NORMAS DE PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

### ENVÍOS EN LÍNEA A TRAVÉS DE eUSAL REVISTAS

Previamente habrá que estar registrado en FarmaJournal; si es así le pedirá el nombre de usuario/a y contraseña.

IR A INICIAR SESIÓN.

En caso contrario tendrá que registrase: IR A REGISTRO.



### LISTA PRELIMINAR PARA LA PREPARACIÓN DE ENVÍOS

Como parte del proceso de envíos, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

- El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
- 2. El archivo de envío está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF o WordPerfect.
- 3. Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones URL para las referencias.
- 4. El texto tiene un interlineado sencillo, un tamaño fuente de 12 puntos, se utiliza cursiva en lugar de subrayado (excepto en las direcciones URL), y todas las ilustraciones, figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados, en vez de al final.
- 5. El texto reúne las condiciones estilísticas y bibliográficas incluidas en Pautas para el autor/a, en Acerca de la revista.
- 6. En el caso de enviar el texto a la sección de evaluación por pares, se siguen las instrucciones incluidas en asegurar una evaluación anónima.

#### DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y las direcciones de correo electrónico introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros o para su uso con otros fines.



. fosfato deshidr**ogenasa (G6PDH) en células de carcinoma de riñón h**umano HEK-293T, mediante la té**cnica del ARN d**e interferencia Beatriz Gutiérrez; Juan P. Bolaños / Detección y prevención de la hipercolesterolemia en los pacientes que acuden a la oficina de farmacia atención farmacéutica. Irene Suárez Antuña: María del Pilar Aldasoro Martín / Caracterización y separación de liposomas por de óxido de hierro como matrices de liberación controlada. Bladimir Vega; Margarita del Arco; Cristina Martín; Marcelino Zazo; Víctor Raposo / **Atención farmacéutica en osteoporosis en la mujer postm**enopáusica. Beatriz Cartujo; Pilar **Aldasoro / Evaluación de las** intervenciones en salud materno-infantil en África subsahariana. Almudena Óvilo; Luis Félix Valero; Ramona Mateos / Atención farmacéutica en DMAE (Degeneración Macular Asociada a la Edad). Lucía Fernández; Javier Muñoz / Nanomedicina en el siglo xxi: ¿un avance contra la enfermedad? Rosa Hernández Martín / El mundo de los biofármacos y los nuevos horizontes terapéuticos. Francisco Zaragoza García / Apoptosis: el suicidio celular es un proceso saludable para nuestra vida. José María Recio Pascual / Actualización en vacunas desde el punto de vista de la epidemiología de las enfermedades. Teresa M.ª Muñoz Cidad / I mesa redonda de becarios de la Facultad de Farmacia de Salamanca. Ana Jiménez López; Pilar Liceras Boíllos; Jonás Samuel Pérez Blanco / Hábitats y vegetación natural en la alta montaña del parque regional de la sierra de Gredos (Castilla y León, Ávila), Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata / Biotech development. Juan R. García Soria / Enfermedades emergentes: la amenada del ébola. Mar Lago Núñez / El debate homeopático. Jesús Fernández-Pérez / Farmacia y universidad. Resumen intervención de Fidel Ortega en la edición Farmaforum 2015, celebrado el día 6 de mayor en Salamanca. Fidel Ortega-Ortiz de Apodaca / Tratamiento de la hepatitis C: situación actual y perspectivas futuras. Silvio Ragozzino / Alimentos transgénicos. Pedro F. Mateos / Valoración de la técnica SmMIT-LAMP para la se<mark>lección molecular de ADN de *Schistosoma mansoni* en muestras de orina. Cristina Martín; Pedro Fernández-Soto; Antonio Muro A</mark> Estudio del proteoma en Malaria. Jesús Morán; Darwin A. Moreno-Pérez; Manuel A. Matarroyo; Antonio Muro / Evaluación del efecto de la cloroquina sobre la autofagia en células tumorales de mama y su posible utilidad como fármaco antineoplásico. Claudia Orallo Luna; Rogelio González Sarmiento / Diseño de una formulación de liposomas para la administración de vacunas. Óscar Delgado Rubio; M.ª José de Jesús Valle; Amparo Sánchez Navarro / PRMs detectados en pacientes en tratamiento con digoxina en urgencias. Laura García Jiménez; Ana María Martín Suárez / Silenciamiento de la glucosa-6.fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en células de carcinoma de riñón humano HEK-293T, mediante la técnica del ARN de interferencia. Beatriz Gutiérrez; Juan P. Bolaños / Detección y prevención de la hipercolesterolemia en los pacientes que acuden a la oficina de farmacia atención farmacéutica, Irene Suárez Antuña: María del Pilar Aldasoro Martín / Caracterización y separación de liposomas por microencapsulación. María José Sánchez Carpintero; Amparo Sánchez Navarro; Mariá José de Jesús Valle / Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como matrices de liberación controlada Bladimir Vega; Margarita del Arco; Cristina Martín; Marcelino Zazo; Víctor Raposo / Atención farmacéutica en osteoporosis en la mujer Almudena Óvilo**; Luis Félix Valer**o; Ramona Mateos / **Atención farmacéutica en DMAE (Degeneración Macular Asociada a la Edad)** de los biofármacos y los nuevos horizontes terapéuticos. Francisco Zaragoza García / Apoptosis: el suicidio celular es un proceso saludable para nuestra vida. José María Recio Pascual / Actualización en vacunas desde el punto de vista de la epidemiología de las enfermedades. Teresa M.ª Muñoz Cidad / I mesa redonda de becarios de la Facultad de Farmacia de Salamanca. Ana Jiménez López;



Fecha de publicación de este volumen: febrero de 2016

