

A detailed 3D molecular model of a protein-ligand complex. The protein is represented by a red and white ribbon structure, with the red ribbon forming the main body and the white ribbon representing the beta-sheets. The ligand is a complex organic molecule with a yellow sulfur atom, blue nitrogen atoms, and red oxygen atoms, shown in a stick representation. The background is a light gray, textured surface.

# ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 86. NÚMERO 2 (2020) · ABRIL - JUNIO  
ACCESO ABIERTO







# ANALES RANF

REAL ACADEMIA  
NACIONAL DE FARMACIA

REVISTA CIENTÍFICA

AÑO 2020 - NÚMERO 02

DOI: 10.32440/ANRAF.2020.89.04

DEPÓSITO LEGAL: M. 3.869-1958

I.S.S.N. 1697-428X / E-ISSN: 1697-428X

VOLUMEN 86. NÚMERO 2 (2020) · ABRIL - JUNIO

## SUMARIO

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

PROPUESTA DE UN MODELO COMPUTACIONAL PARA EL ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES ALOSTÉRICOS DE PTP1B

JAVIER GARCÍA MARÍN

EFFECTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TAGETES LUCIDA SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS

SHIGELLA FLEXNERI Y SALMONELLA TYPHI

JORGE A. ALMEIDA, RODOLFO GARCIA, ET AL.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL DE ECUADOR ELABORADO

ARTESANAL E INDUSTRIALMENTE

ANA K. ALBUJA, JANNETH GALLEGOS, ET AL.

ADHERENCIA TERAPÉUTICA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CRÓNICAS DEL CLUB DE ADULTOS MAYORES DE UN CENTRO DE

SALUD, ECUADOR

ADRIANA C. RINCÓN, NANCY X. GUSÑA Y RAMÍREZ, ET AL.

QUIMIOTERAPIA NANOMÉTRICA A BASE DE CANNABINOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES GINECOLÓGICOS

ANA I. FRAGUAS, ANA I. TORRES, ET AL.



Foto de cubierta y portada: Geometrías iniciales de los complejos BB2-enzima para la dinámica molecular (izquierda PTP1B y derecha TCPTP. Artículo pp. 99-112)



## REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Protección de datos: Anales RANF declara cumplir lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Depósito Legal: M. 3.869-1958

I.S.S.N. 1697-428X

DOI: 10.1016/j.anales.2020.100000

Publicación trimestral

(4 números al año)

© 2020. Anales RANF

Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, ni transmitido por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, ni registrado por ningún sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

Anales RANF, a los efectos previstos en el artículo 32.1 párrafo segundo del vigente TRLPI, se opone de forma expresa al uso parcial o total de las páginas de Anales RANF con el propósito de elaborar resúmenes de prensa con fines comerciales.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

*Disponible en internet:*

*[www.analesranf.com](http://www.analesranf.com)*

*Atención al lector:*

*[anales@ranf.com](mailto:anales@ranf.com)*

*Anales RANF.*



---

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA  
Calle de la Farmacia, 9-11 (Madrid)  
Teléfonos: 91 531 03 07 / 91 531 65 51  
I.S.S.N 1697-428X

---



### **Presidente Comité Editorial**

*Doadrio Villarejo, Antonio L.  
Presidente de la Real Academia  
Nacional de Farmacia*

### **Directora Ejecutiva**

*Salaices Sánchez, Mercedes.  
Vicesecretaria de la Real Academia  
Nacional de Farmacia*

### **Editor Científico**

*Menéndez Ramos, José Carlos  
Académico de Número de la Real Academia  
Nacional de Farmacia*

### **Consejo Editorial**

*Avendaño López, Carmen  
Ribas Ozonas, Bartolomé  
Villar del Fresno, Ángel María  
Sellés Flores, Eugenio  
Lacadena Calero, Juan Ramón  
Francés Causapé, M<sup>a</sup> Del Carmen  
Pascual-Leone Pascual, Ana María  
Rodríguez-Boto, Gregorio  
Salinas Sánchez, Jesús  
Académicos de la Real Academia  
Nacional de Farmacia*

### **Coordinación RANF**

*Manuel Tirado Juárez*

### **Coordinación ARP**

*Luis Javier Aróstegui Plaza*

### **Diseño web**

*Montse López Ferres*

### **Diseño revista**

*M. Nieves Gallardo Collado*

### **Comité Científico**

*Tamargo Menéndez, Juan  
Mayor Zaragoza, Federico  
Rodríguez Artalejo, Antonio  
Puerto Sarmiento, Javier  
García Sacristán, Albino  
Vilas Sánchez, Vicente  
Rivas Martínez, Salvador  
Nombela Cano, César  
del Castillo García, Benito  
Sentandreu Ramón, Rafael  
Sánchez Muniz, Francisco José  
Abelló Gallo, Juan  
Ortega Ortiz de Apodaca, Fidel  
Basante Pol, Rosa  
Alonso Fernández, María José  
Ortiz Melón, José Miguel  
Giménez Gallego, Guillermo  
Medina Jiménez, José M<sup>a</sup>  
Cerdán García-Esteller, Sebastián  
Barcina Angulo, Yolanda  
Domínguez-Gil Hurlé, Alfonso  
Esteban Rodríguez, Mariano  
Monge Vega, Antonio  
Cabezas Fernández del Campo, J. Antonio  
Sanz Pérez, Bernabé  
Guinovart Cirera, Joan J.  
Vallet Regí, María  
Martínez Fernández, Antonio Ramón  
Miras Portugal, M<sup>a</sup> Teresa  
Manzanares Robles, Jorge*

### **Comité Científico Internacional**

*Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)  
Prof. Lucette Bardet (Francia)  
Kazuhiro Imai (Japón)  
Fernando Quevedo Ganoza (Perú)  
Vincenzo Tortorella (Italia)  
Geoffrey Burnstock (Gran Bretaña)  
Bernard Portha (Francia)  
Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)  
Herbert Zimmermann (Alemania)  
Adolfo Pérez Miravete (Méjico)  
Carl - Göran Eden (Suecia)*



## ÍNDICE

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

p. 99

PROPUESTA DE UN MODELO COMPUTACIONAL PARA EL ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE  
LOS INHIBIDORES ALOSTÉRICOS DE PTP1B

**JAVIER GARCÍA MARÍN**

p. 113

EFFECTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TAGETES LUCIDA SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO D  
E ENTEROBACTERIAS SHIGELLA FLEXNERI Y SALMONELLA TYPHI

**JORGE A. ALMEIDA, RODOLFO GARCIA, ET AL.**

p. 117

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL DE ECUADOR  
ELABORADO ARTESANAL E INDUSTRIALMENTE

**ANA K. ALBUJA , JANNETH GALLEGOS , ET AL.**

p. 125

ADHERENCIA TERAPÉUTICA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CRÓNICAS DEL CLUB DE ADULTOS  
MAYORES DE UN CENTRO DE SALUD, ECUADOR

**ADRIANA C. RINCÓN , NANCY X. GUSÑA Y RAMÍREZ, ET AL.**

p. 133

QUIMIOTERAPIA NANOMÉTRICA A BASE DE CANNABINOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES GINECOLÓGICOS

**ANA I. FRAGUAS , ANA I. TORRES , ET AL.**



# PROPUESTA DE UN MODELO COMPUTACIONAL PARA EL ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES ALOSTÉRICOS DE PTP1B

## PROPOSAL FOR A COMPUTATIONAL MODEL TO STUDY THE SELECTIVITY BETWEEN PTP1B AND ITS ALLOSTERIC INHIBITORS

Javier García Marín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá

\*corresponding author: javier.garciamarin@uah.es

### ORIGINAL

### RESUMEN

La diabetes mellitus tipo II ha emergido como una pandemia mundial, convirtiéndose en un grave problema de salud pública para muchos países. Los tratamientos actuales presentan efectos adversos indeseables, falta de eficacia o simplemente solo tratan los síntomas, no las causas. La proteína tirosina fosfatasa 1B se ha reconocido como una diana prometedora para el tratamiento de esta enfermedad. A pesar de todos los estudios realizados sobre esta enzima, apenas existe conocimiento acerca de la selectividad entre esta y la tirosina fosfatasa de linfocitos T, su homólogo más cercano, responsable de complicados efectos adversos. En este estudio, las aproximaciones computacionales aplicadas a un inhibidor alostérico previamente descrito de esta enzima, han permitido identificar un residuo de fenilalanina como crucial para esta selectividad. Los resultados han permitido explicar esta selectividad desde el punto de vista bioquímico y guiarán el diseño de nuevos fármacos más potentes y selectivos.

### ABSTRACT

*Diabetes mellitus type II has spread as a problematic pandemic for countries all over the world. Despite of the current available treatments, approved drugs still show undesirable side effects, loss of efficacy or they target symptoms instead of causes. Since its discovery, protein tyrosine phosphatase 1B has emerged as a very promising target against this disease. Despite of the information about the enzyme, there is no knowledge regarding the selectivity between this enzyme and its closest homologue, lymphocyte T tyrosine phosphatase, responsible of complicate side effects. In this study different computational approaches have let us to highlight the importance of a phenylalanine residue located in protein tyrosine phosphatase 1B, but no in its homologue, as a crucial hotspot that causes selectivity. These results let to explain the observed selectivity and they can be used as a guide for the design of new inhibitors.*

#### Palabras Clave:

Diabetes mellitus  
Tirosina fosfatasa  
Dinámica molecular  
Selectividad

#### Keywords:

Diabetes mellitus  
Tyrosine phosphatase  
Molecular dynamic  
Selectivity



## 1. INTRODUCCIÓN

La *Organización Mundial de la Salud* (OMS) define la diabetes mellitus como: "una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce". Ésta se clasifica principalmente en dos tipos atendiendo a su origen etiopatológico. Por un lado, la diabetes mellitus tipo I, también conocida como insulino dependiente, afecta principalmente a personas jóvenes e individuos que son incapaces de producir insulina de forma endógena. Por otro lado, la diabetes mellitus tipo II (DM II), es una afección más propia de personas en edad adulta y/o avanzada, las cuales han desarrollado resistencia a la acción de esta hormona en los tejidos periféricos de su cuerpo. A estas dos variantes se le la diabetes gestacional que se manifiesta en mujeres durante el embarazo y que puede suponer un aumento del riesgo de padecer DM II en etapas posteriores de la vida.

Si bien todas las formas presentan síntomas similares, destacando: poliuria, polidipsia y polifagia (todos ellos patognómicos de la enfermedad), los trastornos visuales, complicaciones cardiovasculares y la afección renal son las consecuencias que hacen de la DM II una de las mayores causas de morbi-mortalidad en los países desarrollados (1) actualmente. Del mismo modo, la diabetes no sólo se ha relacionado con las complicaciones mencionadas anteriormente sino también con un aumento en la prevalencia de ciertas neoplasias, así como de deterioros cognitivos, como la enfermedad de Alzheimer (2). Las elevadas cifras de prevalencia de este trastorno lo convierten en una pandemia de la era moderna, estimándose que en 2012 la carga total de mortalidad asociada a la DM II fue de 3,7 millones de muertes. Además, en 2014 se estimó una prevalencia total de la enfermedad de 422 millones de personas (mayores de 18 años), siendo Europa la tercera región con mayor prevalencia (64 millones de afectados) según el Informe Mundial sobre la Diabetes publicado en el 2016 por la OMS. Debido al cambio en los hábitos de vida y al aumento de la esperanza de vida, se estima que estas cifras seguirán elevándose en los años venideros, constituyendo un auténtico problema no sólo para las personas afectadas, sino también para los sistemas de salud encargados de hacer frente a este reto económico y asistencial para la salud pública.

En la actualidad, el arsenal farmacológico disponible para el manejo en pacientes de la DM II lo constituyen los hipoglucemiantes no insulínicos (sulfonilureas, meglitinidas, metformina, tiazolidinonas, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, etc) (3). Sin embargo, estas terapias, focalizadas en el aumento de la insulinemia plasmática, no son totalmente óptimas. Independientemente del número y tipo de efectos adversos, estas aproximaciones no combaten aspectos importantes de la DM II, como la reducción de la sensibilidad

de las células  $\beta$  pancreáticas a la glucosa o el incremento de glucosa vía gluconeogénesis. Por ello, la búsqueda de nuevas dianas y el desarrollo de nuevos antidiabéticos orales continúa siendo una de las principales líneas de investigación, tanto de industrias farmacéuticas como de grupos académicos de todo el mundo.

Hacia finales del siglo XX se clonó el primer gen de una proteína tirosina fosfatasa, identificada como Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) o Proteína Tirosina Fosfatasa de tipo No-receptor (PTPN1) (4). Esta es una enzima de 435 aminoácidos que es capaz de catalizar la hidrólisis de los residuos de fosfotirosina del receptor de insulina activado, y otros sustratos relacionados con la misma, como el sustrato I del receptor de insulina y el receptor de leptina. Esta proteína se ha asociado a los fenómenos de resistencia a la insulina y a la obesidad, al tratarse de un regulador negativo de las vías de señalización de la insulina y la leptina (5). No sólo eso, sino que PTP1B ha sido ampliamente validada como una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de la DM II (6): los ratones knock-out para el gen que codifica esta proteína presentan una mayor sensibilidad a la insulina y a la pérdida de sobrepeso (7). Estos hechos han motivado el desarrollo de numerosas moléculas potenciales candidatas a fármaco capaces de inhibir la PTP1B por parte de la industria farmacéutica (8). Se pueden distinguir dos grandes grupos atendiendo a la zona específica de unión de estas moléculas en la enzima: inhibidores dirigidos al centro activo e inhibidores dirigidos a sitios alostéricos (8), (9). Los primeros constituyen sin ninguna duda la familia más numerosa, con numerosas moléculas de distinta naturaleza, aunque casi todas ellas con la característica común de presentar grupos cargados negativamente a pH fisiológico, con el fin de mimetizar los restos de fosfotirosina presentes en el segmento intracelular del receptor de insulina. Esta característica compromete la biodisponibilidad de todas estas moléculas para su administración por vía oral, dada su baja permeabilidad a través de membranas biológicas. Por otro lado, la alta homología del centro activo de la PTP1B con respecto a otras tirosina fosfatasas, supone un gran inconveniente a la hora de desarrollar inhibidores lo suficientemente selectivos (10). Estos hechos han tenido como resultado que ningún inhibidor dirigido al centro activo haya alcanzado los ensayos clínicos. Por otro lado, existen inhibidores alostéricos de PTP1B, la mayoría de ellos con un carácter mucho más lipófilo, como el eritrotafib, que llegó a ensayos clínicos de fase I, o la trodusquemina (un derivado de fitoesterol), que alcanzó ensayos clínicos de fase II (8). Esto se debe a su mejor biodisponibilidad y mayor selectividad, puesto que los sitios alostéricos de las proteínas no se encuentran tan conservados dentro de una misma familia y suponen una fuente de selectividad (11), (12). Dentro de este grupo de inhibidores destaca una familia de benzbromaronas descrita por Wiesmann en 2004 (Figura 1) (13).

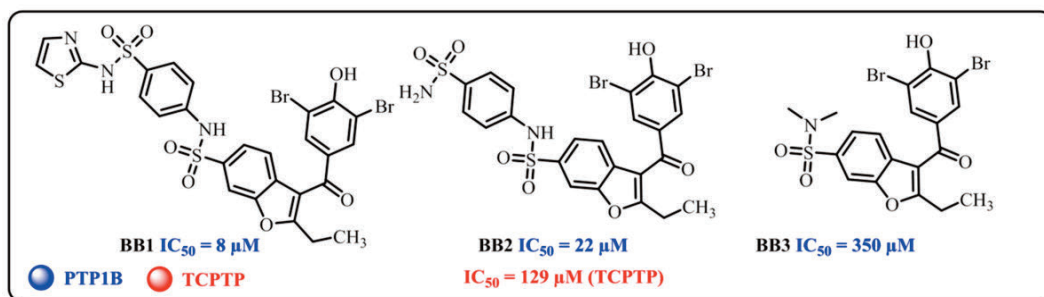


Figura 1. Inhibidores alostéricos de PTP1B descritos por Wiesman y colaboradores y su actividad frente a PTP1B y TCPTP.

Estos compuestos demostraron unirse a una región no antes explorada de la PTP1B que se encuentra a 20 Å del centro activo tal y como se pudo determinar en los estudios de cristalografía de rayos X (PD: 1T48, 1T49 y 1T4J). Esta región está compuesta por las  $\alpha$  hélices 3, 6 y 7 situadas cerca del extremo C-terminal de la proteína, tal y como se puede observar en la Figura 2.

Este hecho supuso el inicio de nuevos programas de búsqueda de inhibidores de PTP1B partiendo del concepto de "diseño basado en estructura" a comienzos del siglo XXI. Esta nueva familia de inhibidores alostéricos es capaz de desplazar el residuo de Trp291 situado en la hélice  $\alpha 7$  de PTP1B con el fin de acomodarse en su interior generando una nueva cavidad y desestructurando la hélice  $\alpha 7$ . La unión del inhibidor desencadena una serie de movimientos en el esqueleto proteico que se traducen en el bloqueo del bucle catalítico de la PTP1B (14). Este bucle, conocido entre todas las tirosina fosfatasas de la familia como WPD-loop, se encuentra en una posición abierta antes de alojar el sustrato en su interior. Una vez los residuos de fosfotirosina se acomodan en el centro catalítico, es necesario el cierre del bucle para que tenga lugar el ciclo catalítico de la enzima. Sin embargo, tras la unión de las benzobromonas al correspondiente sitio alostérico, el WPD-loop queda bloqueado en su conformación abierta de tal manera que, aunque permite que el

sustrato se aloje en su interior, la enzima es catalíticamente inactiva y por lo tanto, queda inhibida (15).

Durante la última década, numerosos estudios computacionales han pretendido arrojar luz al mecanismo de inhibición alostérica, a las bases del diseño de inhibidores o a la dinámica del bolsillo alostérico de PTP1B (16), (17), (14). Sin embargo, no existe ningún tipo de estudio que trate las bases de selectividad entre PTP1B y su homóloga más cercana, la Proteína Tirosina Fosfatasa de Linfocitos T (TCPTP). La inhibición de esta última, con la que PTP1B comparte más de un 71% de identidad, conduce a efectos adversos indeseables como la destrucción de la médula ósea, y procesos de eritropoyesis y linfopoyesis aberrantes (18). Además, los modelos murinos knock-out para el gen de TCPTP demostraron ser inviables a las pocas semanas del nacimiento (19).

Desde su inicio hasta nuestros días, las técnicas de modelado molecular han experimentado un desarrollo exponencial y se han convertido en herramientas indispensables en campos tan variados como la farmacología, biología y bioquímica estructural, el diseño de fármacos y la química biológica (20). Más en concreto, los estudios de dinámica molecular y el cálculo de energía libre han sido aplicados con éxito al estudio de la catálisis enzimática (21), la resistencia a fármacos (22), (23), el diseño de fármacos (24), (25), o la más novedosa farmacología de sistemas (26).

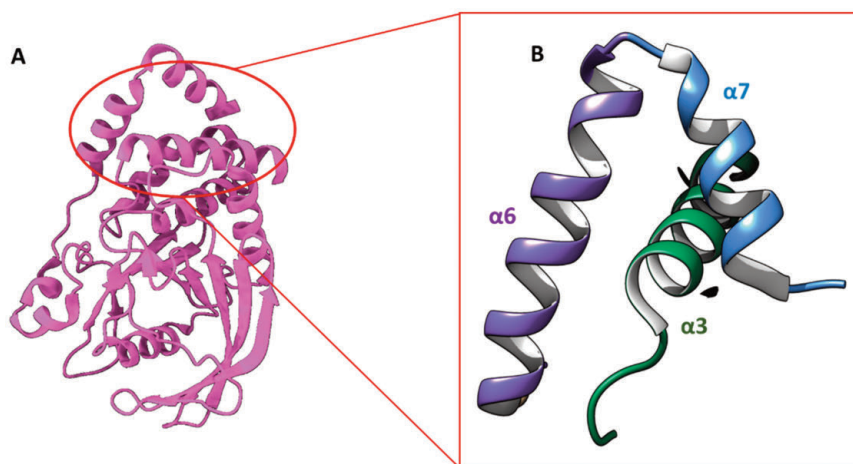


Figura 2. A) Estructura tridimensional de PTP1B (Entrada del PDB:1OEM) B) Ampliación de la estructura sitio alostérico descrito por Wiesman y colaboradores cuando no presenta inhibidor



Teniendo en cuenta todos los antecedentes y la falta de conocimiento acerca de las bases estructurales que rigen la selectividad entre ambas enzimas, clave para la obtención de nuevos fármacos y mejor comprensión de la función de ambas proteínas a nivel molecular, se planteó un estudio computacional que permitiese arrojar luz sobre el mecanismo. El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la benzbromarona BB2, descrita por Wiesmann, mediante técnicas computacionales de dinámica molecular clásica y cálculo de energía libre con el fin de explicar su selectividad y asentar las bases para el futuro el diseño de inhibidores selectivos hacia PTP1B.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Modelado por homología

Dado que no existen estructuras tridimensionales de inhibidores alostéricos con la hélice  $\alpha 7$  resuelta se hizo necesario utilizar técnicas de modelado por homología. Para la construcción de los modelos se emplearon las estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) como 1T48 y 1L8K para PTP1B y TCPTP, respectivamente. Para incorporar las estructuras no resueltas de la hélice  $\alpha 7$  en ambas proteínas y el loop  $\alpha 6$  en 1L8K, se empleó un método descrito en la bibliografía previamente con el fin de crearlas con el *WPD-loop* abierto (27). Junto a estas estructuras se utilizó la PTP1B completa y con el *WPD loop* cerrado 2F6F. Del mismo modo, se utilizó el ligando BB2 presente en 1T48 para introducir restricciones en ambos modelos. Los moldes se alinearon con las secuencias de la base de datos génica Uniprot para ambas enzimas (P18031 para PTP1B y P17706 para TCPTP) a través de la interfaz gráfica de usuario del programa *Modeller* 9.2 en UCSF *Chimera* 1.13 (ver material complementario) (28). Los modelos mejor posicionados según su puntuación en la función Z-DOPE de *Modeller* fueron seleccionados y sometidos a una inspección visual para ajustar aquellos rotámetros peor posicionados. El estado de protonación de la proteína se investigó empleando el servidor H++ (29), a continuación, tanto el modelo como la red de enlaces de hidrógeno se comprobó y optimizó con el servidor *WHAT-IF* (30). Tras esto se comprobaron los mapas de Ramachandran con el fin de validar la calidad de los modelos (ver material complementario).

### 2.2. Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo empleando la suite de programas *Amber 16* junto con *AmberTools 16* (31). La proteína se describió empleando el campo de fuerzas ff14SB, mientras que para el ligando se utilizó GAFF. Las cargas de este últimos se asignaron empleando el módulo Antechamber y ajustándolas a un nivel teórico AM1-BCC. Ambos complejos se sol-

vataron en un cubo de moléculas de aguas TIP3P de 12 Å de tamaño de lado y se adicionaron 5 iones de sodio con el fin de neutralizar el sistema empleando el módulo Leap de *AmberTools*. A continuación, se pasó a la fase de preparación del sistema por pasos: minimización de los hidrógenos, minimización de las moléculas de disolvente, minimización del sistema completo (aplicando un potencial de restricciones de 5 kcal/mol en los  $C_{\alpha}$  de la proteína), calentamiento hasta los 300 K durante 20 ps con las mismas restricciones, equilibrado durante 100 ps a 300 K (manteniendo constante el número de partículas, temperatura y volumen) y equilibrado, liberando las restricciones posicionales gradualmente durante 100 ps (manteniendo constante temperatura, volumen y presión). Tras esta última fase de equilibrado, se pasó a la producción de dos réplicas para cada sistema de dinámica molecular clásica durante 25 ns, empleando un intervalo de integración de 2 fs. La producción se llevó a cabo a través de GPUs utilizando el módulo PMEMD.CUDA implementado en Amber. Los cálculos requirieron 7 días para completar cada una de las réplicas. Todos los sistemas se simularon por duplicado empleando las condiciones de límite periódico, y aplicando el método de Ewald para tratar las interacciones electrostáticas de corto alcance con un límite de 8 Å. Así mismo, se empleó el algoritmo *SHAKE* (32) en todos los enlaces en los que participan átomos de hidrógeno con el fin de simplificar los cálculos durante la dinámica. Las trayectorias de la dinámica molecular se analizaron empleando el software *Cpptraj*, *VMD* y *Chimera*.

### 2.3. Cálculos con WaterSwap

Para el cálculo de la energía libre se empleó el programa basado en el método de Montecarlo, *WaterSwap* (33). Las estructuras empleadas para llevar a cabo estos cálculos procedían de los 15 ns de dinámica cuando el sistema se encontraba en equilibrio termodinámico. Los cálculos se llevaron a cabo en el módulo implementado en el paquete de programas Sire, utilizando los mismos datos de topología y parámetros generados para la dinámica molecular (Amber ff14SB). La energía libre de unión absoluta se calculó mediante el método de integración termodinámica de réplica de intercambio, a lo largo de 16 ventanas de transformación ligando-moléculas de agua. Todos los cálculos requirieron de 7 días para ser completados. Las energías finales se obtuvieron utilizando el script de Python *freerng*, también presente en la suite Sire.

## 3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 3.1. Modelado por homología

Para llevar a cabo el estudio con la benzbromarona BB2, se hizo necesario el uso de técnicas de modelado por homología que permitiesen predecir las estructuras tridimensionales de ambas en-

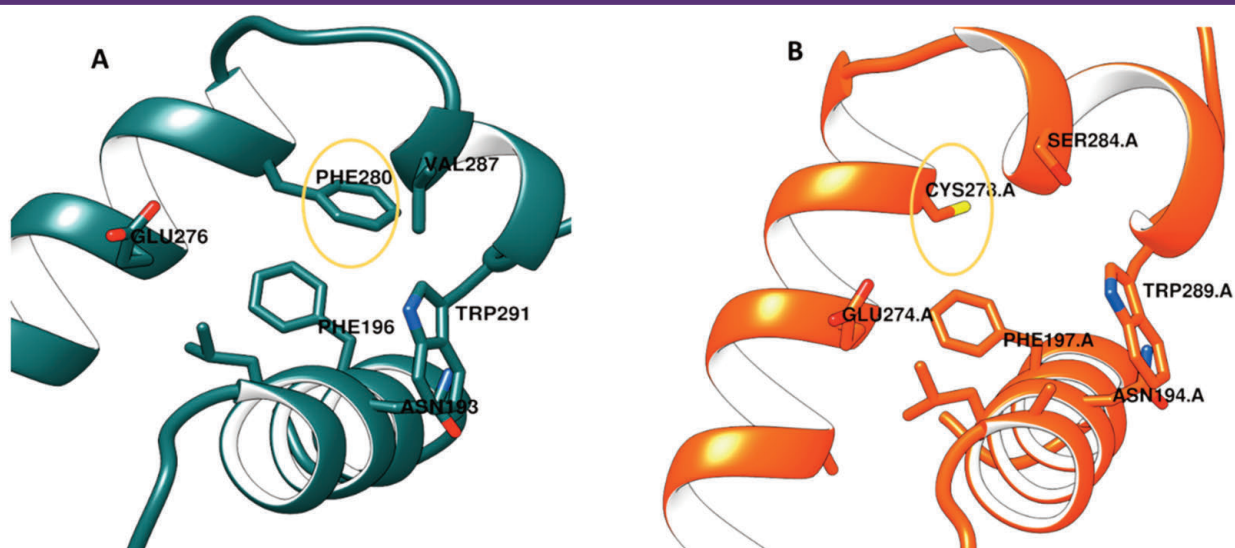


Figura 3. A) Bolsillo alostérico de PTP1B modelada. B) Bolsillo alostérico de TCPTP modelada.

zimas. Las entradas depositadas en el PDB co-cristalizadas con inhibidores alostéricos, carecen de la hélice  $\alpha 7$  como consecuencia de la alta movilidad que presenta esta hélice tras la unión del inhibidor y que imposibilita su resolución por técnicas convencionales de cristalografía de rayos X. Por otro lado, la única estructura disponible de la TCPTP (1L8K) carece también de esta hélice y presenta una baja resolución. Es por esto por lo que se hizo necesario recurrir al modelado por homología para obtener estructuras tridimensionales completas y de buena calidad de ambas enzimas. Para generar los modelos se utilizó el método descrito por Shinde y colaboradores (27), empleando como moldes para el modelado las estructuras cristalinas de PTP1B con el bucle catalítico abierto, 1T48, y con la hélice  $\alpha 7$  resuelta, 2F6F. En el caso de la TCPTP se utilizó 1L8K. Superponiendo los moldes con las correspondientes secuencias de ambas proteínas extraídas de la base de datos Uniprot se generaron modelos en base al alineamiento para ambas enzimas que posteriormente fueron refinados e inspeccionados visualmente de forma cuidadosa. Las estructuras generadas obtuvieron una puntuación Z-DOPE de -1,27 para PTP1B y -1,07 para TCPTP, valores que corresponden a modelos fiables y bien resueltos.

Una vez contruidos, se pasó a llevar a cabo una inspección visual de las estructuras generadas. En primer lugar, la observación del sitio alostérico modelado para ambas enzimas permitió tener una idea de la geometría de este. Como se puede comprobar en la Figura 3, el sitio alostérico está constituido por una cavidad comprendida entre las hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ , con un carácter altamente hidrofóbico debido a la naturaleza de los aminoácidos que lo constituyen.

A pesar de la gran similitud entre los bolsillos alostéricos de ambas enzimas, hay algunas diferencias bastante reseñables: por un lado, el residuo de Phe280 de la PTP1B se encuentra sustituido

por una cisteína que en la secuencia de TCPTP ocupa la posición 278. Esto es una diferencia bastante notable puesto que la naturaleza y tamaño de estos aminoácidos es bastante distinta. Algo similar ocurre con la Val287 que pasa a ser una ocupada por la Ile284 de TCPTP. Así mismo existen algunas diferencias también en el extremo C-terminal, pero estas no fueron contempladas por tratarse de una zona alejada del bolsillo y con alta movilidad. Estos primeros resultados parecen indicar que, si bien ambos son bolsillos hidrofóbicos, el de la TCPTP presentaría un carácter más polar y mayor tamaño por la presencia del residuo de cisteína en lugar de fenilalanina.

### 3.2. Dinámica molecular

Con el fin de profundizar en el proceso de interacción entre BB2 y ambas fosfatases, se llevaron a cabo experimentos de dinámica molecular entre los complejos ligando-enzima. La geometría inicial de los complejos se obtuvo, en el caso de la PTP1B, directamente del cristal, y en el caso de la TCPTP por superposición del ligando BB2 durante la fase de modelado. Un primer vistazo a las geometrías iniciales permite revelar las claves de la interacción, como se puede comprobar en la Figura 4.

Las benzobromaronas se asientan en la cavidad alostérica estableciendo numerosos contactos hidrofóbicos con residuos de glicina, isoleucina y el esqueleto carbonado de la proteína. Se pueden diferenciar dos enlaces de hidrógeno iniciales: uno por parte del grupo carbonilo de BB2 que interacciona con los residuos Asn193 y Asn194 de PTP1B y TCPTP, respectivamente gracias a su  $-\text{NH}_2$ ; y otro por parte del grupo sulfonamida, a través de su  $-\text{NH}$ , que interacciona con el COOH del Glu276 de PTP1B y el Glu274 en el caso de la TCPTP. Hay que destacar que a los contactos hidrofóbicos se le unen fuertes interacciones de tipo apilamiento- $\pi$  que establece el

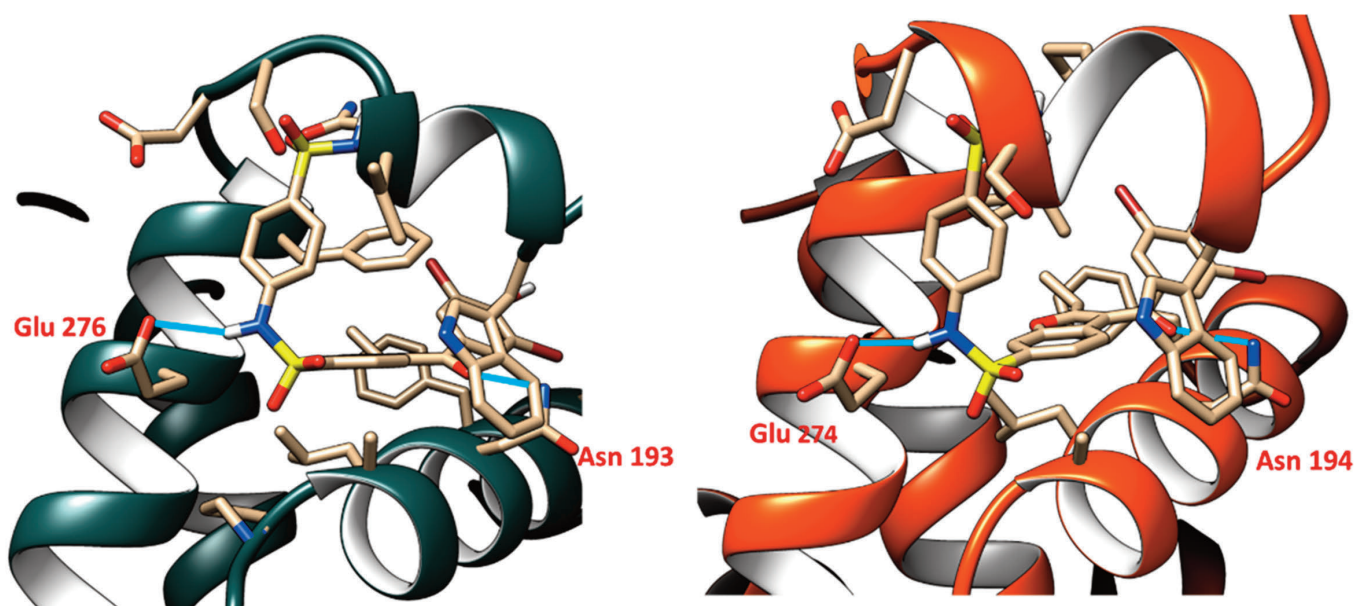


Figura 4. Geometrías iniciales de los complejos BB2-enzima para la dinámica molecular (izquierda PTP1B y derecha TCPTP). Los enlaces de hidrógeno entre la Asn193/194 y el Glu 276/274 se encuentran marcados como líneas azules

esqueleto de benzofurano de **BB2** con los anillos aromáticos de los residuos Phe196, Phe280 y Trp291 de la PTP1B. En el caso de la TCPTP, estos contactos se mantienen a excepción del apilamiento- $\pi$  paralelo de la Phe280, ya que en esta posición se encuentra la Cys278. La pérdida de este apilamiento podría ser una de las causas que contribuyese negativamente a su unión a la TCPTP ( $IC_{50} = 129 \mu M$ ) favoreciendo por tanto la selectividad del compuesto (6 veces más selectivo sobre la PTP1B,  $IC_{50} = 22 \mu M$ ) (13).

Las técnicas de dinámica molecular convencional permiten simular con un alto grado de exactitud los complejos ligando-proteína en condiciones que simulen el ambiente biológico (presencia explícita de disolvente y de iones para fijar el pH y fuerza iónica) a lo largo del tiempo y de este modo poder estudiar los eventos que tengan lugar a nivel molecular. Una vez minimizados los distintos átomos del sistema (para eliminar geometrías forzadas y contactos demasiado cercanos), éste se calentó gradualmente hasta 25 °C, se

hizo una pequeña fase de equilibrado para reestablecer la densidad y se pasó a la fase de producción, donde se generan los resultados de la dinámica que se analizan y comentan durante la discusión.

Uno de los parámetros más empleados para evaluar la estabilidad de los complejos es el cálculo de la desviación cuadrática media (RMSD) a lo largo del tiempo de las trayectorias generadas. Este parámetro representa las fluctuaciones de la posición de los átomos de distintos elementos, como el esqueleto proteico, comparándola con la conformación inicial a lo largo de la simulación. Su monitorización nos permite comprobar si el sistema ha alcanzado el equilibrio (se mantiene estable), o, por el contrario, continúa evolucionando en el espacio conformacional en búsqueda de estados termodinámicamente más favorecidos para el sistema.

Como se puede observar en la Figura 5, ambos sistemas parecen haber alcanzado el equilibrio, especialmente a partir de los 5 ns de dinámica, cuando los valores de RMSD presentan menor

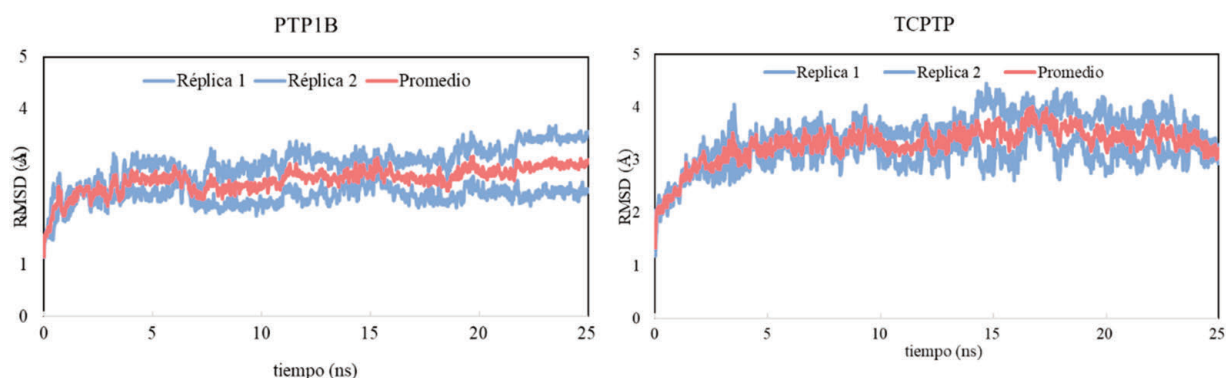


Figura 5. Evolución del RMSD a lo largo de la dinámica molecular para el complejo BB2-PTP1B (izquierda) y BB2-TCPTP (derecha).

fluctuación y se mantienen sin grandes incrementos. No obstante, se pueden encontrar pequeñas diferencias si se estudia el valor medio a lo largo de toda la dinámica para ciertas partes de la proteína. Tal y como recoge la Tabla 1, los valores de RMSD correspondientes a los átomos del soluto (proteína-ligando) son superiores en ambos pares de réplicas para la TCPTP, lo que sugiere una menor estabilidad del complejo y además mayor flexibilidad. Lo mismo se puede deducir de los valores obtenidos para los carbonos alfa del esqueleto peptídico. Además, atendiendo a la movilidad del bucle catalítico de ambas fosfatasa (*WPD-loop*), se puede observar que en el caso de la TCPTP estos valores son ligeramente superiores comparados con su homóloga. Este hecho sugiere que el bucle no se encuentra estabilizado en la conformación abierta (catalíticamente inactiva) de la que se parte en ambas dinámicas. Esta posición queda fijada tras la unión del inhibidor alostérico, sin embargo, en ausencia de éste, el bucle tiende a moverse entre la conformación abierta y la cerrada (34) (catalíticamente activa) lo que se traduce en una movilidad mayor y por tanto en valores superiores de RMSD.

**Tabla 1. Valores medios de RMSD a lo largo de toda la simulación de dinámica molecular**

	PTP1B		TCPTP	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Complejo	2,93 ± 0,3	2,32 ± 0,21	3,12 ± 0,33	3,47 ± 0,48
Ca	2,4 ± 0,42	1,66 ± 0,22	2,28 ± 0,35	2,78 ± 0,51
WPD-loop	1,29 ± 0,29	1,33 ± 0,25	1,44 ± 0,27	1,57 ± 0,27

Dado que el estudio general del RMSD del complejo parece sugerir una menor estabilidad en el caso de la TCPTP, se decidió analizar por separado este valor para los átomos pesados (distintos de hidrógeno) que forman la benzbromarona **BB2**.

Como se puede observar en la Figura 6, el ligando no solo presenta un valor bastante más alto en el caso de la TCPTP (2,18 Å de media en ambas réplicas frente a 0,63 de PTP1B), sino que además fluctúa más en el interior del bolsillo, lo que se observó durante la visualización de las trayectorias de la dinámica. Este fenómeno

se debe a la ausencia de la interacción correspondiente a la Phe280 (sustituida por un residuo de cisteína en la TCPTP), y a un apilamiento- $\pi$  paralelo que mantiene mucho más fijo el ligando en el caso de PTP1B. El análisis de estos valores de RMSD parece estar de acuerdo con la actividad experimental observada, lo cual supone una validación del método teórico.

La pérdida de estabilidad del complejo TCPTP también se puede constatar midiendo las distancias entre los átomos que participan en el enlace de hidrógeno entre el carbonilo de BB2 y el residuo de asparagina presente en ambas proteínas.

Para el análisis de este enlace de hidrógeno se tomaron como límites una distancia de 3.5 Å y un ángulo de relajación entre los pares de átomos participantes de 30 °C.

Tal y como se puede observar en la Figura 7, a pesar de que el enlace de hidrógeno se mantiene dentro de la distancia estándar durante la mayor parte de la dinámica existen diferencias significativas en ambas las simulaciones para ambas enzimas. En el caso de la TCPTP las fluctuaciones en la distancia de este enlace son más abundantes y frecuentes alcanzando distancias superiores a 3,5 Å y por tanto incompatibles con la existencia de un enlace de hidrógeno.

Este hecho se debe a que **BB2** presenta una mayor movilidad dentro de la cavidad de TCPTP por la falta de la interacción de apilamiento extra con la fenilalanina que lo mantendría más fijo tal y como previamente fue observado. Este hecho da lugar a una distorsión en la geometría y posición carbonilo de BB2 con respecto a la asparagina, dificultando así la formación de un enlace de hidrógeno.

Si bien, durante el transcurso de la simulación de dinámica molecular estos fueron los enlaces de hidrógeno más estables, no fueron los únicos. El grupo carbonilo de **BB2** es capaz de establecer eventualmente interacciones con el NH del Trp291PTP1B o Trp279TCPTP. Sin embargo, esta interacción es mucho menos estable, y a ella se le une un enlace de hidrógeno temporal entre el grupo SO<sub>2</sub> de la sulfonamida (a través del átomo de oxígeno) que se puede establecer con los NH del esqueleto peptídico de la proteína. Junto a estos, se les unen enlaces de hidrógeno con una persis-

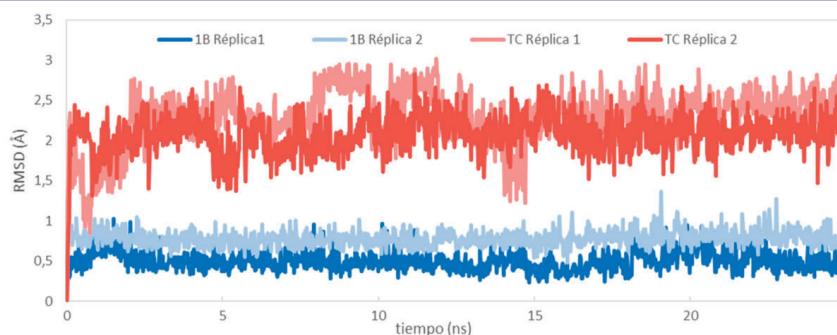


Figura 6. Evolución de los valores de RMSD de BB2 a lo largo de la dinámica molecular tanto para la PTP1B (azul) como TCPTP (rojo)

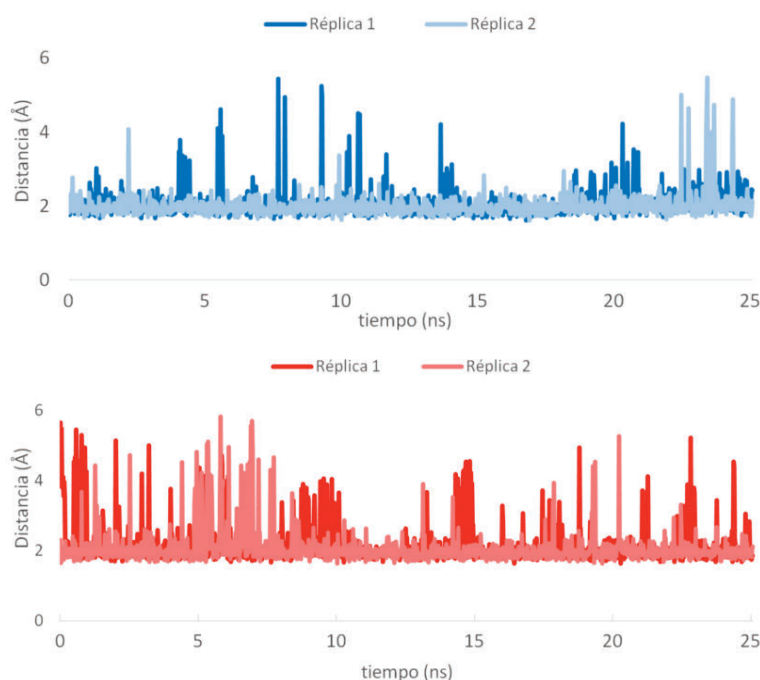


Figura 7. Monitorización a lo largo del tiempo de la distancia entre el oxígeno carbonílico de BB2 y el NH de la asparagina: Arriba PTP1B, abajo TCPTP

tencia menor al 2% que ocurren en momentos concretos de la dinámica molecular. No obstante, el número total de enlaces de hidrógenos establecidos a lo largo del tiempo por el ligando en ambos complejos también presenta diferencias.

En la Figura 8 se muestra el número total de enlaces de hidrógenos que es capaz de establecer BB2 con su proteína a lo largo del tiempo en una replicada de cada sistema. Como se puede observar existen dos enlaces de hidrógeno que se mantienen relativamente estables a lo largo del tiempo que son los estudiados previamente. Sin embargo, en el diagrama se refleja la posibilidad de nuevos enlaces de hidrógeno con otros grupos funcionales. Se puede observar que existe una mayor población de enlaces de hidrógeno en el caso del complejo BB2-PTP1B. Este hecho refleja la mayor estabilidad del ligando dentro de esta proteína a diferencia de TCPTP, lo que a su vez se traduce en una menor afinidad por este

último, debida en gran parte a la menor estabilidad del complejo formado.

### 3.3. Cálculo de energía libre

La afinidad de un fármaco por su diana está íntimamente relacionada con la energía libre de unión a la misma ( $\Delta G$ ) (35). Durante los últimos años, los químicos y bioquímicos computacionales han desarrollado numerosos algoritmos con el fin de determinar este parámetro, de gran utilidad durante el proceso de desarrollo de fármacos, especialmente en las campañas *hit-to-lead* (36). Del mismo modo, el cálculo de la energía libre de unión puede ser empleado para discernir la afinidad y, por tanto, la selectividad de un mismo ligando por dos dianas distintas (37). Para determinar la energía libre de unión de BB2 hacia la PTP1B y TCPTP se decidió emplear un método bastante novedoso conocido como *WaterSwap*

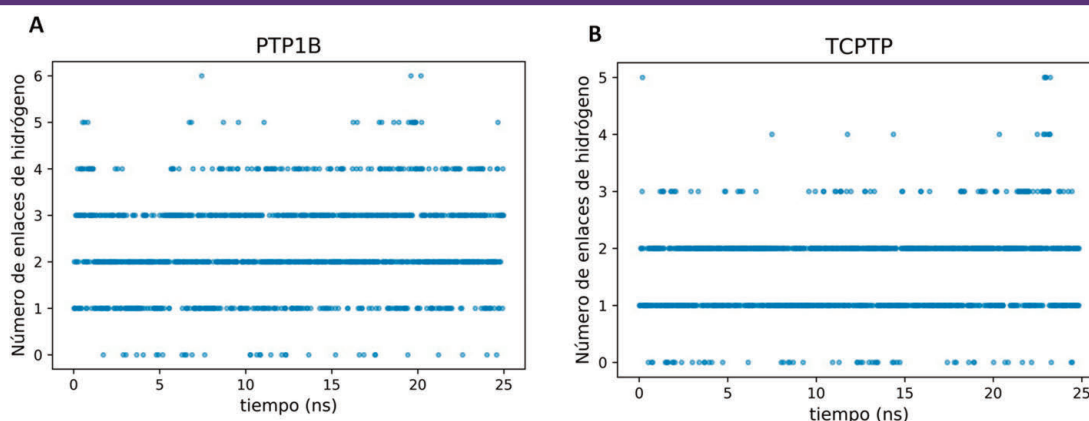


Figura 8. Diagramas de número total de enlaces de hidrógenos establecidos a lo largo de la dinámica entre el ligando y PTP1B (A) y TCPTP (B)

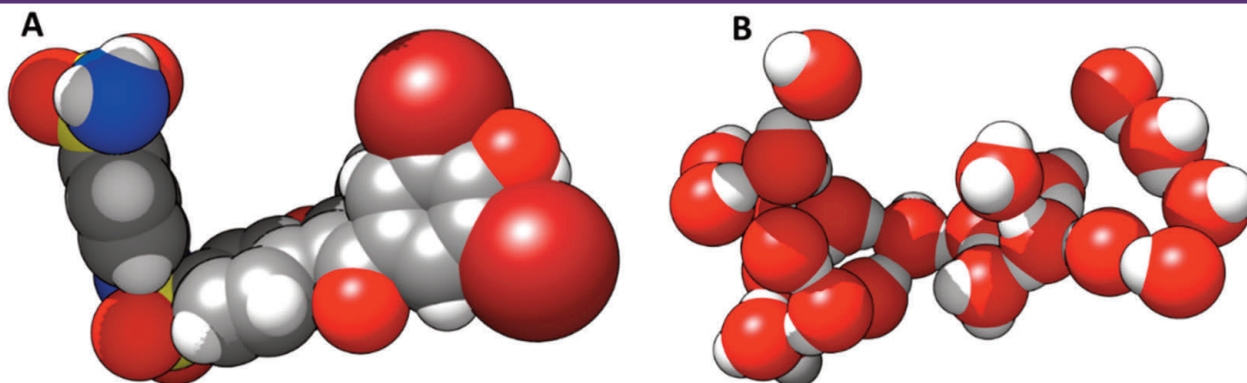


Figura 9. A) Aspecto tridimensional de BB2 durante la simulación con *WaterSwap*. B) Moléculas de agua intercambiadas por BB2 durante la simulación de *WaterSwap*

(33). Este algoritmo emplea coordenadas de reacción para intercambiar el ligando en el interior del sitio de unión por un número de moléculas de agua equivalente a su volumen (Figura 9).

Una vez intercambiados, se calcula la energía libre absoluta a través de tres métodos distintos a lo largo del gradiente de coordenadas de reacción: algoritmo de Bennets, integración termodinámica (IT) y perturbación de energía libre (PEL). A lo largo de las coordenadas de reacción se emplean además movimientos de Montecarlo que permitan tener en cuenta la flexibilidad del sistema y promediar los gradientes de energía libre. Cuando los tres valores son similares, la simulación de *WaterSwap* ha encontrado la convergencia en las coordenadas de reacción y se puede tomar la media de ambos como valor de energía libre absoluta.

**Tabla 2. Resultados WaterSwap para el cálculo de energía libre (kcal/mol) entre BB2 y PTP1B o TCPTP**

WATERSWAP	PTP1B	TCPTP
Bennetts	-15,65	-3,64
PEL	-13,9	-4,99
IT	-15,65	-3,29
$\Delta G$ Media	-15,06	-3,97

Como se puede observar en la Tabla 2, la simulación ha alcanzado la convergencia puesto que las desviaciones de los valores promedio para la PTP1B y la TCPTP son inferiores a 1 (0,82 y 0,47 kcal/mol, respectivamente). Resultó muy interesante comprobar la capacidad que tiene este método para discernir entre la afinidad de BB2 por una su diana PTP1B, y sin embargo no mostrar a penas afinidad por TCPTP. Para la PTP1B los valores de  $\Delta G$  están cercanos a las -15 kcal/mol, siendo valores acordes a un proceso de unión favorable y de un ligando de potencia media. En el caso de la TCPTP, los valores son mucho peores (-3,97 kcal/mol). Esto quiere decir que el proceso de unión de BB2 hacia la TCPTP no es favorable termodinámicamente por lo que la afinidad por esta es muy baja, lo cual es acorde a los valores experimentales de  $IC_{50}$ . Este hecho lo

explica la falta del contacto hidrofóbico y del apilamiento  $\pi$  que proporciona el residuo Phe280 de la PTP1B. La presencia de cisteína y serina en TCPTP da lugar a un aumento en el tamaño de la cavidad (343 Å<sup>3</sup> en comparación con los 227 Å<sup>3</sup> de la PTP1B) que en condiciones normales está ocupada por moléculas de agua. La interacción con la Phe280 de la PTP1B juega un papel clave, ya que permite compensar la pérdida de entropía por desolvatación del receptor con la contribución entálpica a la energía libre de unión que proporciona el apilamiento- $\pi$  de los anillos aromáticos e interacciones de Van der Waals.

Si se estudia la contribución energética de los residuos que rodean el ligando se pueden observar cómo se cumple esta hipótesis.

Tal y como se muestra en la Figura 10 el cambio del residuo Phe280 por Cys278 supone una pérdida de la energía de unión de casi 2 kcal/mol completas, confirmándose una vez más la importancia de este residuo. Además, la falta de esta interacción supone, como se comentó anteriormente, una pérdida de la estabilidad del ligando en el bolsillo de unión. Este efecto se observa en cómo algunos aminoácidos contribuyen en menor medida a la energía de unión en el caso de la TCPTP como por ejemplo la serina o incluso el triptófano. La mayor movilidad que presentan ahora estos aminoácidos tiene como consecuencia una mayor dificultad para la desolvatación del sitio de unión y reemplazar las moléculas de agua por BB2. Cabe destacar que el residuo de Glu a pesar de presentar un enlace de hidrógeno estable durante la dinámica no presenta una energía libre de unión favorable. Esto puede deberse a que se encuentra muy cercano al anillo de benceno del ligando y la desolvatación del mismo no está muy favorecida a pesar de que luego se establezca un enlace de hidrógeno.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se podría formular un modelo farmacofórico que permitiese diseñar inhibidores potentes y selectivos de PTP1B (Figura 11). Básicamente este farmacóforo lo constituiría un núcleo de anillos aromáticos bien carbó o heterocíclicos responsables del apilamiento- $\pi$  paralelo con la Phe280.

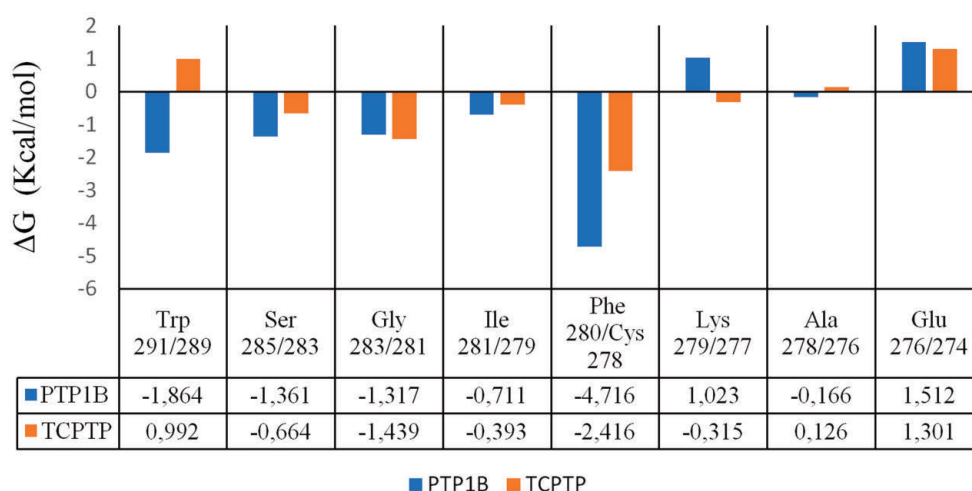


Figura 10. Contribución energética por residuo a la unión de BB2 en aminoácidos seleccionados de PTP1B y TCPTP

Estos deberían estar unidos en la disposición adecuada al aceptor de enlace de hidrógeno necesario para interactuar con el residuo de Asn193. A estos puntos se le uniría un donador de enlace de hidrógeno situado fuera de este plano a 4 Å y 34° capaz de interactuar con el residuo de Glu274, preferiblemente un grupo sulfonamida por su geometría. Finalmente, este debería estar unido a otro anillo aromático capaz de interactuar por apilamiento- $\pi$  en forma de T con el residuo de Phe280.

#### 4. CONCLUSIONES

Desde su descubrimiento hasta nuestros días, numerosos grupos de investigación han intentado desarrollar fármacos inhibidores de PTP1B al tratarse de una de las dianas más prometedoras para el tratamiento de la DM II. El fracaso de la mayoría de estos fármacos se debe a su baja biodisponibilidad y a la falta de selectividad frente a otras fosfatasa, especialmente la TCPTP. Si bien se ha profundizado tanto experimental como computacionalmente en el des-

arrollo de inhibidores del sitio activo, el bolsillo alostérico no ha sido tan explorado hasta el momento. Dado que el diseño racional de fármacos y más en concreto las técnicas computacionales hoy día son cruciales en la identificación de nuevas moléculas con potencia farmacológica se ha planteado un estudio teórico sobre la selectividad de los inhibidores alostéricos entre PTP1B y TCPTP. Las técnicas de dinámica molecular y cálculo de energía libre han permitido proponer una hipótesis sólida acerca de la selectividad entre ambas proteínas. Los modelos así generados han demostrado una mayor estabilidad de la PTP1B frente a la TCPTP, lo cual está en acorde a los valores experimentales de  $IC_{50}$  y valida esta aproximación.

La afinidad de un fármaco por su diana viene determinada por el número de interacciones totales que establece con la misma. Este estudio demuestra cómo a pesar de que en ambos sistemas las interacciones son similares a priori, no lo es su comportamiento. En el caso de la TCPTP los enlaces de hidrógenos resultaron ser menos estables y mantenidos a lo largo del tiempo, teniendo un efecto negativo en la estabilidad del sistema y por tanto en la afinidad total

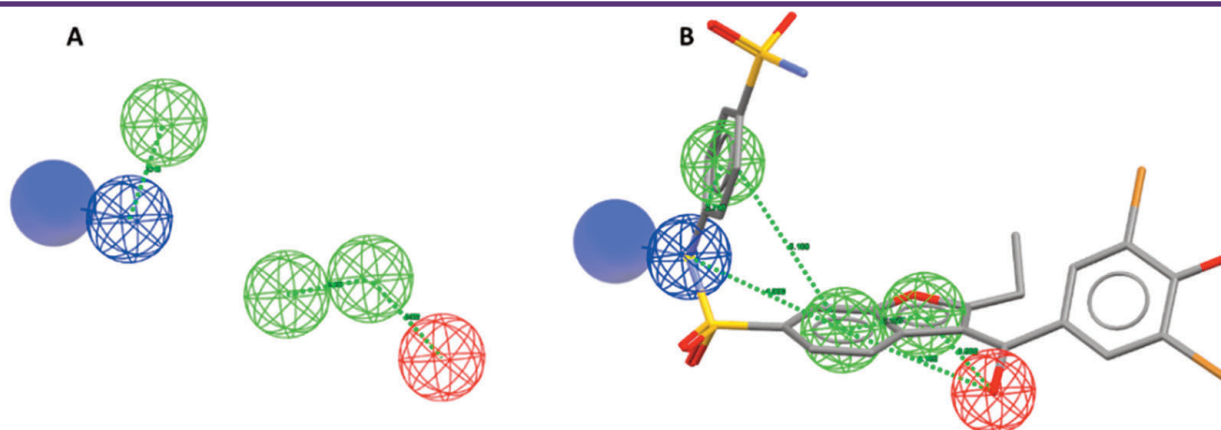


Figura 11. A) Modelo farmacofórico para inhibidores alostéricos y selectivos de PTP1B. B) Superposición del modelo y BB2, en la que se muestran las interacciones aromáticas (verde), aceptoras (roja) y donadoras (azul) de enlace de hidrógeno y su proyección geométrica



de BB2 por TCPTP. Más en concreto, nuestras simulaciones han revelado cómo el papel clave lo juega la falta de un residuo de fenilalanina en la TCPTP que estabiliza el complejo enzima-receptor a través de interacciones de apilamiento- $\pi$  y además contribuye a la energía libre de unión y por tanto a la afinidad de forma decisiva. Si bien, los enlaces de hidrógenos son de las interacciones intermoleculares más fuertes, el anormal entorno hidrofóbico del bolsillo alostérico parece favorecer mucho más las interacciones de carácter apolar y aromáticas, acusando la repercusión que tiene el residuo de Phe280 en PTP1B.

La combinación de estas dos aproximaciones computacionales no sólo ha servido de base para hacer una propuesta sólida acerca de esta selectividad y generar un modelo cualitativo, sino que podrá utilizarse para el diseño de nuevos inhibidores puesto que ha demostrado, y especialmente los cálculos de energía libre, ser capaz de discernir las diferencias y los determinantes que hacen que esta unión sea favorable hacia PTP1B, en acorde a los valores experimentales.

Del mismo modo, se ha puesto de manifiesto como estas técnicas computacionales constituyen una herramienta de gran utilidad para comprender procesos bioquímicos a nivel molecular. Así pues, este estudio también abre una puerta para el diseño racional de fármacos dirigidos a esta diana y que presenten la selectividad suficiente para progresar en ensayos clínicos.

## 5. LISTADO DE ABREVIATURAS

Organización Mundial de la Salud (OMS), diabetes mellitus tipo II (DMII), Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), proteína tirosina fosfatasa de linfocitos T (TCPTP), Protein Data Bank (PDB), raíz cuadrada de la desviación cuadrática media (RMSD), integración termodinámica (IT) y perturbación de energía libre (PEL).

## 6. AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Universidad de Bristol los medios y recursos computacionales de alto rendimiento para poder llevar a cabo todas las simulaciones del trabajo, así como la financiación del EPSRC. Así mismo, se agradece al profesor Adrian Mulholland la aceptación en su grupo de investigación y a la doctora Kara E. Raghnan por sus consejos. Del mismo modo, el autor agradece al doctor Ramón Alajarín su ayuda en la supervisión y confección del manuscrito y al doctor Juan José Vaquero por la aceptación en su grupo de investigación. Finalmente, se agradece al Ministerio de Economía y Competitividad la concesión de una ayuda FPU (FPU16/01647) y a la Universidad de Alcalá por la concesión de una Ayuda de Movilidad en el año 2018 (Bolsa de Viajes 2018).

## 7. REFERENCIAS

- Chatterjee S b, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. The Lancet. 2017;389(10085):2239-51.
- Wong E, Backholer K, Gearon E, Harding J, Freak-Poli R, Stevenson C, et al. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Diabetes & Endocrinology. 2013;1(2):106-14.
- Gómez-Huelgas R, Martínez-Castelao A, Artola S, Górriz JL, Menéndez E. Tratamiento de la diabetes tipo 2 en el paciente con enfermedad renal crónica. Medicina Clínica. 2014;142(2):85.e1-.e10.
- Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, Neel BG. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. Cell. 1992;68(3):545-60.
- Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. PTP1B: A simple enzyme for a complex world. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2013;48(5):430-45.
- Barr AJ. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. Future Medicinal Chemistry. 2010;2(10):1563-76.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. Science. 1999;283(5407):1544-8.
- Johnson TO, Ermoloeff J, Jirousek MR. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. Nature Reviews Drug Discovery. 2002;1:696.
- Hussain H, Green IR, Abbas G, Adekenov SM, Hussain W, Ali I. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as potential anti-diabetes agents: patent review (2015-2018). Expert Opinion on Therapeutic Patents. 2019;29(9):689-702.
- Low J-L, Chai CLL, Yao SQ. Bidentate Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. Antioxidants & Redox Signaling. 2013;20(14):2225-50.
- Grover AK. Use of Allosteric Targets in the Discovery of Safer Drugs. Medical Principles and Practice. 2013;22(5):418-26
- Rocheville M, Garland SL. An industrial perspective on positive allosteric modulation as a means to discover safe and selective drugs. Drug Discovery Today: Technologies. 2010;7(1):e87-e94.
- Wiesmann C, Barr KJ, Kung J, Zhu J, Erlanson DA, Shen W, et al. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. Nature Structural & Molecular Biology. 2004;11:730.
- Li S, Zhang J, Lu S, Huang W, Geng L, Shen Q, et al. The Mechanism of Allosteric Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. PLOS ONE. 2014;9(5):e97668.
- Baskaran SK, Goswami N, Selvaraj S, Muthusamy VS, Lakshmi BS. Molecular Dynamics Approach to Probe the Allosteric Inhibition of PTP1B by Chlorogenic and Cichoric Acid. Journal of Chemical Information and Modeling. 2012;52(8):2004-12.

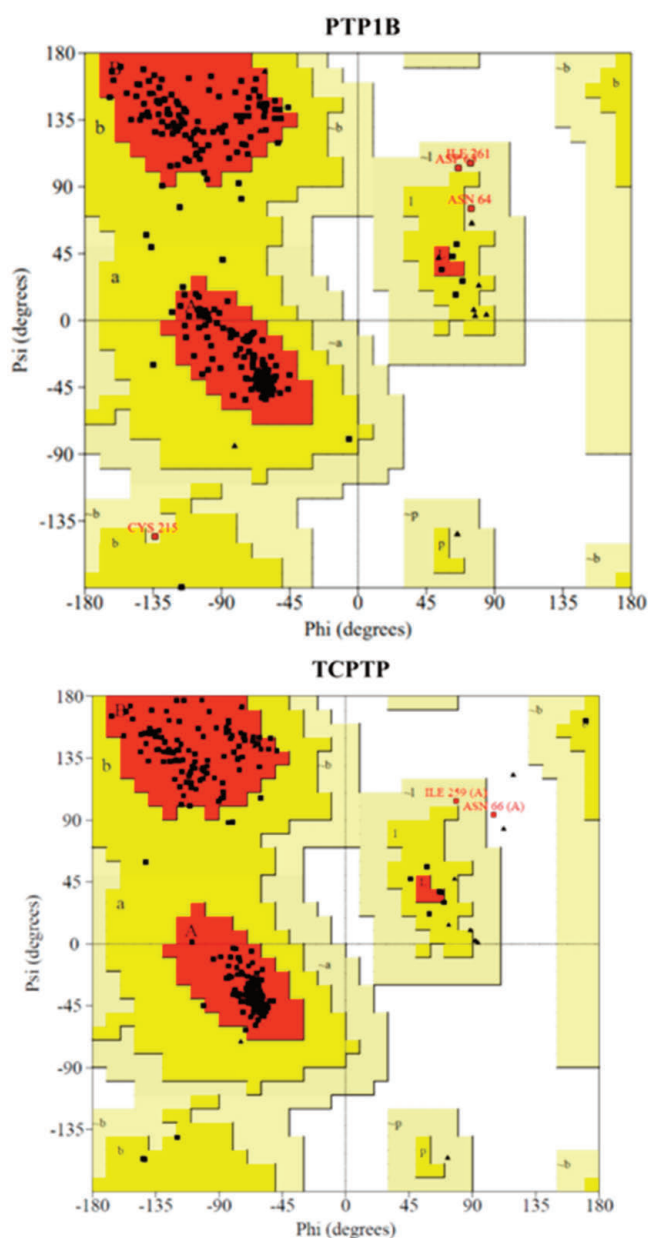


16. Shinde RN, Sobhia ME. Binding and discerning interactions of PTP1B allosteric inhibitors: Novel insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2013;45:98-110
17. Cui W, Cheng Y-H, Geng L-L, Liang D-S, Hou T-J, Ji M-J. Unraveling the Allosteric Inhibition Mechanism of PTP1B by Free Energy Calculation Based on Umbrella Sampling. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013;53(5):1157-67.
18. Zhang S, Chen L, Luo Y, Gunawan A, Lawrence DS, Zhang Z-Y. Acquisition of a Potent and Selective TC-PTP Inhibitor via a Stepwise Fluorophore-Tagged Combinatorial Synthesis and Screening Strategy. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(36):13072-9.
19. Li X, Wang L, Shi D. The design strategy of selective PTP1B inhibitors over TCTP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016;24(16):3343-52.
20. Wade RC, Salo-Ahen OMH. *Molecular Modeling in Drug Design*. Molecules (Basel, Switzerland). 2019;24(2):321.
21. Mendoza F, Gómez H, Lluç JM, Masgrau L. **a1**,4-N-Acetylhexosaminyl-transferase EXTL2: The Missing Link for Understanding Glycosidic Bond Biosynthesis with Retention of Configuration. *ACS Catalysis*. 2016;6(4):2577-89.
22. Woods CJ, Malaisree M, Long B, McIntosh-Smith S, Mulholland AJ. Computational Assay of H7N9 Influenza Neuraminidase Reveals R292K Mutation Reduces Drug Binding Affinity. *Scientific Reports*. 2013;3:3561.
23. Callegari D, Ranaghan KE, Woods CJ, Minari R, Tiseo M, Mor M, et al. L718Q mutant EGFR escapes covalent inhibition by stabilizing a non-reactive conformation of the lung cancer drug osimertinib. *Chemical Science*. 2018;9(10):2740-9.
24. Liu X, Shi D, Zhou S, Liu H, Liu H, Yao X. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2018;13(1):23-37.
25. Rudling A, Gustafsson R, Almlöf I, Homan E, Scobie M, Warpman Berglund U, et al. Fragment-Based Discovery and Optimization of Enzyme Inhibitors by Docking of Commercial Chemical Space. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(19):8160-9.
26. Wang T, Wu Z, Sun L, Li W, Liu G, Tang Y. A Computational Systems Pharmacology Approach to Investigate Molecular Mechanisms of Herbal Formula Tian-Ma-Gou-Teng-Yin for Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(668).
27. Shinde RN, Kumar GS, Egbal S, Sobhia ME. Screening and identification of potential PTP1B allosteric inhibitors using in silico and in vitro approaches. *PLOS ONE*. 2018;13(6):e0199020
28. Šali A, Blundell TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*. 1993;234(3):779-815.
29. Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(W1):W537-W41.
30. Rodriguez R, Chinea G, Lopez N, Pons T, Vriend G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics*. 1998;14(6):523-8.
31. Case DA, Cheatham TE, 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Jr., et al. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of computational chemistry*. 2005;26(16):1668-88.
32. Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*. 1977;23(3):327-41.
33. Woods CJ, Malaisree M, Hannongbua S, Mulholland AJ. A water-swap reaction coordinate for the calculation of absolute protein-ligand binding free energies. *The Journal of Chemical Physics*. 2011;134(5):054114.
34. Cui DS, Lipchick JM, Brookner D, Loria JP. Uncovering the Molecular Interactions in the Catalytic Loop That Modulate the Conformational Dynamics in Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Journal of the American Chemical Society*. 2019;141(32):12634-47.
35. Lamoree B, Hubbard RE. Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). *Essays Biochem*. 2017;61(5):453-64.
- ## 8. MATERIAL COMPLEMENTARIO
- Alineamiento de las secuencias generado con el programa *Modeller* durante el proceso de modelado por homología.
- 
- | P17706 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P17706 | M | P | T | T | I | E | R | E | E | L  | D  | T  | Q  | R  | R  | W  | Q  | P  | L  | Y  | L  | E  | I  | R  | N  | E  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

## 8. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Alineamiento de las secuencias generado con el programa *Modeller* durante el proceso de modelado por homología.





## DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Si desea citar nuestro artículo:

Javier García Marín

**Propuesta de un modelo computacional para el estudio de la selectividad de los inhibidores alostéricos de PTP1B**

An Real Acad Farm [Internet].

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 2 (2020) · pp. 99 -112

DOI: <http://>



# EFFECTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TAGETES LUCIDA SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS SHIGELLA FLEXNERI Y SALMONELLA TYPHI

## EFFECT OF THE HEXANIC EXTRACT OF TAGETES LUCIDA ON THE INHIBITION OF THE GROWTH OF ENTEROBACTERIA SHIGELLA FLEXNERI AND SALMONELLA TYPHI

Jorge Ángel Almeida-Villegas<sup>1</sup>; Rodolfo García-Contreras<sup>2</sup>; Miriam Deyanira Rodríguez<sup>3</sup>; Yahira Katherine Porras-Hernández<sup>4</sup>; Meliksetyan Lilit Surenovna<sup>5</sup>; María Fernanda Arroyo-Mejía<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Microtec, Departamento de bacteriología, Toluca, Estado de México, México

<sup>2</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología, Ciudad de México, México

<sup>3</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina, Toluca, Estado de México, México

<sup>4</sup> Universidad Industrial de Santander UIS, Bucaramanga, Santander, Colombia

<sup>5</sup> Heraci Pathology Lab, Yerevan, Armenia

\*corresponding author: angelalmeidavillegas@gmail.com

### ORIGINAL

#### RESUMEN

La resistencia a los antibióticos aumenta la búsqueda de nuevas estrategias para combatir las enfermedades que causan, y el uso de plantas medicinales representa una estrategia altamente efectiva y valiosa, como el uso de *Tagetes lucida* con diferentes bacterias gram positivas y gram negativas.

**Objetivo:** Evaluar la actividad biológica que tiene el extracto hexánico de la planta *Tagetes lucida* a diferentes concentraciones sobre la inhibición del crecimiento en placa y tubo de dos enterobacterias, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi*

**Métodos:** En el siguiente trabajo, se evaluó un extracto de hexano de *Tagetes lucida* sobre la inhibición del crecimiento de dos enterobacterias, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi* utilizando diferentes concentraciones de vehículo para evaluar si afectaba el crecimiento bacteriano y también diferentes concentraciones de extracto para evaluar la actividad. **Resultados:** Realizados los estudios por triplicado se logró concretar que a partir de 75 µl/µg de extracto se logra una inhibición casi total del crecimiento de ambas bacterias, tanto en método de placa, como en método de tubo. Y a partir de 100 µl/µg se logra una inhibición total.

**Conclusiones:** Los resultados favorables obtenidos con 75 µl/µg, permiten confirmar que los extractos de plantas medicinales son una estrategia importante para combatir infecciones bacterianas multi-resistentes. Por otro lado permite dar paso a un estudio para evaluar los metabolitos más activos del extracto, así como, el mecanismo de acción sobre la inhibición del crecimiento de las bacterias en estudio.

#### ABSTRACT

*Antibiotic resistance increases the search for new strategies to combat the diseases they cause, and the use of medicinal plants represents a highly effective and valuable strategy, such as the use of Tagetes lucida with different gram positive and gram negative bacteria.*

**Objective:** To evaluate the biological activity of the hexane extract of the *Tagetes lucida* plant at different concentrations on the inhibition of growth in plaque and tube of two enterobacteriaceae, *Shigella flexneri* and *Salmonella typhi*

**Methods:** In the following work, a hexane extract from *Tagetes lucida* was evaluated on the growth inhibition of two enterobacteriaceae, *Shigella flexneri* and *Salmonella typhi* using different concentrations of vehicle to evaluate if it affected bacterial growth and also different concentrations of extract to evaluate activity.

**Results:** Once the studies were carried out in triplicate, it was possible to specify that from 75 µl/µg of extract, almost total inhibition of the growth of both bacteria was achieved, both in the plate method and in the tube method. And from 100 µl/µg total inhibition is achieved.

**Conclusions:** The favorable results obtained with 75 µl/µg, confirm that medicinal plant extracts are an important strategy to combat multi-drug resistant bacterial infections. On the other hand, it allows a study to be carried out to evaluate the most active metabolites of the extract, as well as the mechanism of action on the inhibition of the growth of the bacteria under study.

#### Palabras Clave:

Resistencia  
Antibacterianos  
Plantas medicinales  
Enterobacterias

#### Keywords:

Resistance  
Antibacterial  
Medicinal plants  
Enterobacteria



## 1. INTRODUCTION

Although antibiotics probably saved more lives than any other type of medication in the course of human history, bacterial infections remain a leading cause of death, and the options for treating these infections are decreasing, due to the increase in Antibiotic resistant bacteria. In fact, several bacterial strains are currently resistant to virtually all known antibiotics. Like carbapenems, cephalosporins, macrolides and penicillins (1). Due to the resistance problems and the low development of new antibiotics, the door is opened for further research and their development (2).

Commonly used medicinal plants of could be an excellent source of drugs to fight off this problem (3).

The genus *Tagetes* belongs to the *Asteraceae* family (tribe *Tageteae*) and consists of approximately 40-50 species. Is an aromatic herb distributed naturally from Mexico to Honduras, at elevations between 1000 and 2000 m. It has sessile, glabrous, oblong-lanceolate and opposite leaves (5-10 cm long) with yellow terminal flowers (4).

*Tagetes lucida* is a native aromatic plant that was and remains being one of the most important ritual plants used frequently in Mexico. Its common names include "pericon". It is a common weed and not of conservation concern. Pharmacological studies of *T. lucida* aerial parts or flowers have reported, insecticidal, cytotoxic, antioxidant and antidepressant-like effects, however, anxiolytic, sedative or anticonvulsant effects have not yet been studied (5). *Tagetes lucida* has a rich history. It is a medicinal herb that has historically been used to treat many different ailments, such as malaria, dysentery, asthma, diarrhea, fever, and tumors (6)

A study by Guillermo and collaborators in 2006 shows that the plant has important effects as an antibacterial, proving its activity with the following bacteria; against the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Shigella boydii*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* [all strains correspond to biotype El-tor] and Gram-positive bacteria, *Bacillus Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (7)

Members of the genus *Shigella* are gram-negative facultative anaerobes that belong to the family, Enterobacteriaceae. They share common characteristics with members of the genus, *Escherichia* and the genetic relatedness clearly suggests that they are a subtype of *E. coli*. The genus is divided into four species, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei* and *Shigella dysenteriae* (8). These species have further distributed into different serotypes based on biochemical differences and O-antigenic variability located on the

lipopolysaccharides membrane. Each species with the exception of *S. sonnei* comprises multiple serotypes among which the most prevalent serogroup *S. flexneri* are counting more than 19 serotypes (9). Causing bacillary dysentery or shigellosis in humans with estimated annual episodes of 160 million and 1.1 million deaths, most of which are children under 5 years old in developing countries. *Shigella* are highly invasive in the colon and the rectum, and are able to proliferate in the host cell cytoplasm, triggering an inflammatory reaction. The clinical manifestations of *Shigella* infection vary from short-lasting watery diarrhea to acute inflammatory bowel disease characterized by fever, intestinal cramp and bloody diarrhea with mucopurulent feces (10). Diarrhoea caused by *Shigella* species is a major public health problem in developing countries because many cases are caused by drug-resistant *Shigella* (11).

*Salmonella* is an enteric bacterial pathogen and a major pathogenic bacterium that causes food poisoning. Its routes of infection include contaminated foods and water. *Salmonella* is a gram-negative bacillus, causes paratyphoid fever, hematosepsis and gastroenteritis as food poisoning pathogens and these pathogens often resist antibiotics such as tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and streptomycin. *Salmonella* has been known to have about 2,500 serotypes, including the most frequently found typhi and typhimurium (12). Typhoid fever is caused by *Salmonella typhi*. Typhoid fever is characterized by diffuse enterocolitis associated with hypertrophy, then necrosis of intestinal and mesenteric lymphoid tissue. Haemorrhage is caused by erosion of a blood vessel (presumably as a result of necrosis of venules and capillaries) by the ulcerating process (13).

## 2. METHODS

### 2.1 Preparation of the extract of *Tagetes lucida*

The collection of *Tagetes lucida* was carried out in the town of San Martín Coapaxtongo located in the Municipality of Tenancingo, Mexico, this population is located at an altitude of 2200 meters above sea level. In the month of October.

The leaves and flowers were separated from the stem to obtain a weight of 50,604 g, which were added in 500 ml of hexane without prior use. The *Tagetes lucida*-hexane mixture is macerated for 168 hours at room temperature in an amber container to avoid contact with sunlight and artificial light.

Subsequently, the mash was filtered with a sieve to remove large remains of *Tagetes* and also with filter paper to remove the residue of flowers and small leaves.

Once hexane was free of *Tagetes* flowers and leaves, it was transferred to a new amber bottle. Thus obtaining 500ml of extract.



## 2.2 Preparation of strains under study and evaluation of the hexanic extract of *Tagetes lucida*

Wild-type strain cultures obtained from stool cultures of patients from the Ixtlahuaca Valentín Gómez Farías General Hospital donated and provided by the microbiology department of the University of Ixtlahuaca CUI who used the strains in their reservoir were used.

Inoculation of tubes with 3 ml of BHI broth with a 0.5 McFarland scale of the enterobacteria was performed. In the case of Petri dishes, a routine sowing of Kirby Bauer was performed.

The tubes with BHI broth inoculated with *Shigella*, two series were performed in triplicate, in the first series 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l and 300  $\mu$ l of vehicle (Hexane) were added. While the second series of tubes with BHI broth and *Shigella*, different concentrations of the hexanic extract were added, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 300  $\mu$ l. Both series of tubes were incubated for 18h at 37 °C.

The tubes with BHI broth inoculated with *Salmonella*, two series were performed in triplicate, in the first series 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l and 300  $\mu$ l of vehicle (Hexane) were added. While the second series of tubes with BHI broth with *Salmonella*, different concentrations of the hexanic extract were added, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 300  $\mu$ l. Both series of tubes were incubated for 18h at 37 °C.

For the determination on the inhibition of the enterobacteria under study, in petri dish, sowing was carried out by the method of Kirby Bauer. Subsequently to the crops were added different concentration of the vehicle (hexane) and another series of the macerated. This was done with each of the enterobacteria in triplicate. Each of the trials and series were performed in triplicate, both for *Salmonella* and *Shigella*. The boxes were incubated for 18h at 37 °C.

## 3. RESULTS

## 4. DISCUSSION

The concentrations under study proved to be highly effective, blocking some pathway for the growth of enterobacteriaceae, and showing that the vehicle does not affect growth, however it is unknown if it affects bacterial-bacterial cellular communication. From 75  $\mu$ l there is almost total inhibition, and with 100  $\mu$ l there is total inhibition of bacterial growth.

The study previously carried out by Céspedes et al, in which they evaluated the activity of different molecules obtained from the *Tagetes lucida* plant on Gram positive and Gram negative bacteria, inspired its replication of the present work, modified in several aspects as follows.

Firstly, the solvent used to macerate *Tagetes lucida* used by Céspedes was methanol, then the separation, identification and purification of different coumarins and flavonoids were carried out, which were individually evaluated as growth inhibitors of the bacteria under study. In the study carried out in our research group, *Tagetes lucida* obtained and collected in Tenancingo de Degollado, State of Mexico, was used, while the one studied by Céspedes was collected in the State of Michoacan, which influences the type and quantity of secondary metabolites expressed by the plant.

A further change in the replication of the study is the solvent used, while Céspedes used methanol, a polar solvent, in our study hexane, a non-polar solvent, was used. Therefore, the difference in secondary metabolites can vary even more, not only due to the geographical difference in the collection of the plant, but also the type of metabolites obtained by the solvent used. On the other hand, Céspedes purified each of the metabolites found in the mash, while we used the mash with all the metabolites that could be obtained from the process. A control experiment was made in triplicate with hexane as well as a petri dish, to verify that the solvent did not affect bacterial growth and that the effect that occurred was mainly due to the action of *Tagetes lucida*.

BHI growth conditions	<i>Shigella flexneri</i>		<i>Salmonella typhi</i>	
	Tube	Petri dish	Tube	Petri dish
No treatment	++++	++++	++++	++++
100 $\mu$ l of vehicle (hexane)	++++	++++	++++	++++
200 $\mu$ l of vehicle (hexane)	++++	++++	++++	++++
300 $\mu$ l of vehicle (hexane)	++++	++++	++++	++++
25 $\mu$ l of extract	++++	++++	++++	++++
50 $\mu$ l of extract	+++	+++	+++	+++
75 $\mu$ l of extract	+	+	+	+
100 $\mu$ l of extract	-	-	-	-
150 $\mu$ l of extract	-	-	-	-
200 $\mu$ l of extract	-	-	-	-
250 $\mu$ l of extract	-	-	-	-
300 $\mu$ l of extract	-	-	-	-

Table 1. This table shows the inhibition achieved in the growth of *Shigella* and *Salmonella*, both with vehicle and with extract. Where + + + + represents representative growth, + + + partial inhibition and - total inhibition of bacterial growth.



Céspedes observed inhibitions with good results from diluting 400 µg of compound. However, I did not achieve total inhibitions at said study concentration. On the other hand, with the *Shigella* bacteria they failed to obtain growth inhibition. In our study, carried out from 75 µl of macerate, a partial inhibition of *Shigella* was achieved, something that was not observed in the Céspedes study. Thus, the difference in the secondary metabolites, as well as the mixture of the same in the macerate, have potentiated the effect, and thus achieved an inhibition of *Shigella*, and a total inhibition of both enterobacteria from 100 µl of extract.

Another point that could reflect the lack of activity on the part of the molecules studied by Céspedes is that both strains of *Shigella* are wild-type strains, and the resistance to certain compounds can vary not only from one geographical area to another, but also between the type of sample of isolated, and the genotypes and phenotypes expressed.

## 5. CONCLUSION

The use of extracts of medicinal plants that have antimicrobial activity suggests an alternative under study to combat infectious diseases resistant to antibiotics.

It suggests a phytochemical panel for determining the active metabolites of the extract and evaluating which is the most active against bacterial growth. As well as elucidating the mechanism by which such inhibition is achieved and whether it also inhibits the release of virulence factors. It was found that the solvent did not affect growth, different concentrations of the macerate were evaluated.

## 6. FINANCING

The following research work was not funded by any institution.

## 7. ACKNOWLEDGMENT

We thank all authors and Universities immensely for their support in carrying out this project. We dedicate this work especially to Victoria, daughter of the main authors.

## 8. REFERENCES

1. Arroyo Mejía M. F., Valdez Arcos O., Almeida Villegas J.A., Resistance to antibiotics; a perspective, Rev. Med. Inv., 2019: 7(2): 67-72
2. Arroyo Mejía M. F., López López O. O., Almeida Villegas J.A., Resistencia a antibióticos. Breve revisión. MedLab., 2019: 11 (4): 3-12
3. Manandhar S., Luitel S., Kumar-Dahal R., In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. J. Trop. Med. 2019: 1895340. <https://doi.org/10.1155/2019/1895340>
4. Ciccio J. F. A source of almost pure methyl chavicol:volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica Rev. Biol. Trop. 2004: 52(4), 853-857.
5. Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., et al. *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. Journal of Ethnopharmacology, 2016: 181: 221–228. doi:10.1016/j.jep.2016.01.040
6. Kurpis, J., Serrato Cruz, M. A., Feria Arroyo, T. P. Modeling the effects of climate change on the distribution of *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae). Global Ecology and Conservation, 2019: e00747. doi:10.1016/j.gecco.2019.e00747.
7. Céspedes, C. L., Avila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., et al. Antifungal and antibacterial activities of mexican tarragon (*Tagetes lucida*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006: 54(10): 3521–3527. doi:10.1021/jf053071w.
8. Jennison, A.V. Verma, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development, FEMS Microbiology Reviews, 2004: 28(1): 43–58. doi.org/10.1016/j.femsre.2003.07.002.
9. Nisa, I., Qasim, M., Yasin, N., et al., *Shigella flexneri*: an emerging pathogen. Folia Microbiologica. 2020, 65, 275–291. doi:10.1007/s12223-020-00773-w
10. Qi Jin., et al., Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157., Nucleic Acids Research, 2002: 30(20): 443-4441 doi.org/10.1093/nar/gkf566
11. Xiao-Ying Pu., et al., Characterization of fluoroquinolone-resistant *Shigella flexneri* in Hangzhou area of China. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009: 63: 917–920 doi:10.1093/jac/dkp087
12. Min-Soo K., et al., A study on the prevention of *salmonella* infection by using the aggregation characteristics of lactic acid bacteria., Toxicol Res., 2013: 29(2): 129–135. doi: 10.5487/TR.2013.29.2.129
13. Everest, P., Wain, J., Roberts, M., et al. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. Trends in Microbiology, 2001: 9(7): 316–320. doi:10.1016/s0966-842x(01)02067-4

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors deny having problems due to a conflict of interest.

Si desea citar nuestro artículo:  
Jorge Ángel Almeida-Villegas; Rodolfo García-Contreras; et al.  
**Effect of the hexanic extract of *Tagetes lucida* on the inhibition of the growth of enterobacteria *Shigella flexneri* and *Salmonella typhi***  
An Real Acad Farm [Internet].  
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 2 (2020) pp. 113 -115  
DOI: <http://>



# EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL DE ECUADOR ELABORADO ARTESANAL E INDUSTRIALMENTE

## EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF TRADITIONAL LEAF CHEESE IN ECUADOR BOTH HANDCRAFTED AND INDUSTRIALLY PRODUCED

Ana Karina Albuja Landi<sup>1,4\*</sup>; Janneth Gallegos<sup>1,2</sup>; Paola Vargas Vargas<sup>2</sup>; Paola Arguello Hernández<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo "SAGID". Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>4</sup>Facultad de Salud Pública. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

\*corresponding author: aalbuja@epoch.edu.ec

### ORIGINAL

#### RESUMEN

Uno de los quesos frescos tradicionales típicos del Ecuador es el queso de hoja, un queso de pasta hilada, que se elabora de manera artesanal envuelto en hoja de achira (*Canna indica*), mientras en la industria es empaquetado al vacío en bolsas de polietileno. En el presente estudio se comparó la calidad microbiológica de estos quesos, evaluando los indicadores de la calidad higiénico-sanitaria, además se cuantificaron y caracterizaron fenotípicamente bacterias ácido lácticas (BAL). Las muestras se recolectaron en queseras artesanales y plantas industriales de la ciudad de Latacunga. Se determinaron recuentos de aerobios mesófilos aplicando la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529 5, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se analizaron utilizando placas Petrifilm (AOAC 991.14 - AOAC 2003.07). El recuento de bacterias ácido lácticas empleó el método PRT-712.02-047. Los resultados de los indicadores de la calidad higiénico-sanitaria: coliformes, *E. coli* y *S. aureus* examinados en los quesos de hoja artesanales y de elaboración industrial, en todos los casos superaron los límites de aceptabilidad establecidos por la normativa ecuatoriana, sugiriendo deficiente calidad higiénica de los procesos o incorrecta manipulación de la leche empleada como materia prima. Los recuentos de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en los quesos industriales presentaron una reducción estadísticamente significativa comparados con los recuentos de estos microorganismos en los quesos artesanales, esto corresponde a una diferencia en porcentaje de 18,15 % y 14,27 % respectivamente. Se aisló un total de 32 cepas de bacterias de ácido láctico, estas mostraron características fenotípicas similares, pero tuvieron una respuesta diferente a la tolerancia a niveles de pH (4.4; 9.4) y NaCl (6.5 %). Es importante complementar la evaluación microbiológica con un análisis sensorial para evaluar el efecto de las BAL sobre las características organolépticas de los quesos de hoja de procedencia artesanal e industrial.

#### ABSTRACT

One of the traditional fresh cheeses in Ecuador is the artisanal leaf cheese, a kind of stretched-curd cheese. The artisanal product is wrapped in achira leaves (*Canna indica*), while the industrial leaf cheese is packed at vacuum in high density polyethylene bags. In this study the microbiological quality of both products was compared. The hygienic-sanitary microbial indicators and lactic acid bacteria (LAB) were quantified. The LAB isolated were characterized phenotypically. The samples were obtained from artisanal cheese-making and industrial located in Latacunga city province Cotopaxi.

The total aerobic mesophilic count was made based on national regulations (NTE INEN 1529 5); total coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was evaluated using petrifilm methods (AOAC 991.14 - AOAC 2003.07) and to LAB was used PRT-712.02-047. The results show high quantities of total coliforms, *E. coli* and *S. aureus* in both products, these data exceed the limits of acceptability established in Ecuadorian regulations, this evidence poor hygienic quality of the processes or incorrect controls of milk as raw material. The lactic acid bacteria count showed statistically significant differences, the industrial cheeses had a reduction of 18,15% of *Lactobacillus* and 14,27% of *Lactococcus* compared with artisanal cheeses. A total of 32 strains of lactic acid bacteria were isolated, these showed similar phenotypic characteristics, but these had a different response at the level of pH (4,4;9,4) and NaCl (6,5%). The sensory evaluation will be an important complement in this type of study.

#### Palabras Clave:

Bacterias ácido lácticas  
Calidad higiénico-sanitaria  
Quesos de hoja artesanal  
Queso de hoja industrial

#### Keywords:

Lactic acid bacteria  
Sanitary quality  
Artisan leaf cheese  
Industrial leaf cheese

## 1. INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento, que aporta a la dieta de la población, a la vez que constituye un bien cultural alimentario, y sustenta una cadena de valor local de importancia económica, que puede contribuir al desarrollo local y regional (1).

Entre los quesos elaborados en el mundo están los quesos de pasta hilada que incluyen variedades de quesos como el Mozzarella, Provolone, Scamorza, Caciocavallo originados en el norte del mediterráneo (Italia, Grecia, los Balcanes, y Turquía), su principal característica es el tratamiento térmico aplicado una vez obtenida la cuajada, la cual es sumergida en agua, suero o salmuera calientes y se manipula mecánica o manualmente hasta obtener una consistencia plástica seguida de moldeado según la forma y tamaño deseado (2). Uno de los ingredientes de estos quesos es un cultivo iniciador empleado para incrementar la acidez de la leche y subsecuentemente de la cuajada lo que permitirá su plastificación y estimamiento por efecto del calentamiento (3).

Uno de los quesos tradicionales elaborados en Ecuador y que se encuentra en la categoría de pasta hilada, es el queso de hoja, la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1528, lo define como un producto no madurado obtenido a partir de queso criollo acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de Ecuador no patógenas; sometido a calentamiento previo al hilado, su característica es la envoltura en hoja de achira (*Canna indica*) (4).

Este producto está catalogado como patrimonio culinario de la región Sierra (5). Las ciudades en las que se elaboran y comercializan con su particular envoltura son Cayambe y Latacunga (6), sin embargo, estos quesos no cuentan con notificación sanitaria, en contraste, las plantas procesadoras de lácteos los comercializan envasados al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad y con la respectiva notificación sanitaria.

Las queseras artesanales generalmente elaboran su producto con leche no pasteurizada, esto genera su acidificación por la actividad metabólica de las bacterias nativas, debiendo aplicarse las prácticas correctas de higiene en su elaboración para prevenir la contaminación cruzada, y evitar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos. En el caso de los quesos de hoja procedentes de plantas industriales, al recibir la leche un tratamiento térmico, que disminuye las bacterias patógenas, también disminuye la microbiota nativa. En este marco, el objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad microbiológica de los quesos de hoja en términos de microorganismos indicadores de la calidad higiénico – sanitaria, adicionalmente se evaluaron niveles de las bacterias ácido lácticas y se caracterizaron fenotípicamente 32 aislados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Localización geográfica del estudio

El estudio se realizó con muestras seleccionadas de queso de hoja artesanal e industrial elaborado en la ciudad de Latacunga ( $0^{\circ}56'6.8''$  S  $78^{\circ}36'55.9''$  O), provincia de Cotopaxi - Ecuador.

### 2.2 Toma de muestras

Las muestras se tomaron de tres queseras artesanales (QHA1, QHA2, QHA3), que empaican sus productos en hojas de achira (*Canna indica*) y de una industria local (QHI1, QHI2), que los comercializa en bolsas de plástico de polietileno de alta densidad Figura 1.

De cada quesera se tomaron aleatoriamente 2 muestras por un periodo de tres semanas consecutivas, examinando un total de 30 muestras de acuerdo a lo especificado por la Norma NTE. INEN 1529-2-2013 (7). Las muestras fueron tomadas de los lugares de comercialización.



Figura 1. Queso de Hoja A: industrial empacado en bolsas de plástico de polietileno de alta densidad; B: artesanal empacado en hojas de achira

### 2.3 Material y método

Para la preparación de las diluciones de las muestras de queso de hoja se trabajó, con diluciones sucesivas de orden diez según lo especificado por la norma NTE INEN 1529-2-2013 (7) utilizando como diluyente agua de peptona al 0,1%.

#### 2.3.a Recuento de microorganismos aerobios mesófilos

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1529-5 (8), por el método de inoculación con vertido en placa, utilizando 1 mL de la dilución requerida en PCA (DIFCO 770572), incubando a  $30.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  de 48 a 75 h.



### 2.3.b Recuento de bacterias coliformes, *E. coli* y *S. aureus*

Para este ensayo se emplearon los métodos oficiales para recuentos mediante la técnica de Petrifilm, AOAC 991.14 para *E. coli*/coliformes (9) y AOAC 2003.07 para *S. aureus* (7).

### 2.3.c Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL)

Para el recuento de BAL se consideró como referencia la Norma PRT-712.02-047 (10) del Instituto de Salud Pública de Chile y la Norma ISO 16068 (11), empleando el método de vertido en placa. Los recuentos de lactobacilos se realizaron en el medio MRS (Man Rogosa Sharpe, OXOID CM0361), acidificado a pH 4.5 y los recuentos de *Lactococcus* en el medio M17 Agar (OXOID CM0785). Se mezcló 1 mL de la dilución requerida con agar fundido, incubando las placas a 37 °C por 72 h en condiciones aeróbicas para el medio MRS (10). Mientras que para el agar M17, las placas se incubaron a 32 °C por 48h en condiciones microaerófilas utilizando el sistema de jarras Gas-Pack (10).

Para conocer la reducción del crecimiento de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en quesos industriales respecto a BAL de quesos artesanales, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = (\text{No} - \text{Nf}) / \text{No} \times 100.$$

Donde:

No = Población de *Lactobacillus* o *Lactococcus* (valor promedio) en quesos artesanales.

Nf = Población de *Lactobacillus* o *Lactococcus* (valor promedio) en quesos industriales.

### 2.3.d. Caracterización fenotípica de aislados de BAL

Los cultivos de BAL provenientes de queseras artesanales e industriales se examinaron macroscópicamente previa la selección de colonias de morfología más representativa, cada colonia se purificó mediante 3 transferencias sucesivas en un nuevo medio de cultivo hasta la obtención de cultivos puros, después cada colonia se examinó para la respuesta al Gram y los ensayos: catalasa, oxidasa, movilidad, crecimiento a 10 °C y 45 °C, en medio salino con concentración de NaCl 6.5 % y NaCl 18 %, a pH 4.4 y pH 9.6 además la producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa.

### Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos de enumeración de los indicadores de higiene y de BAL, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía, seguido por el test de Tukey ( $P < 0.05$ ) empleando el software INFOSTAT 2017 para determinar las diferencias significativas.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Recuento de microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria

En la Tabla 1 se aprecia la diferencia en los niveles poblacionales de algunos indicadores de calidad higiénico-sanitaria (*Coliformes*, *E. coli*, *S. aureus*) en los quesos de hoja de elaboración artesanal e industrial.

**Tabla 1. Recuentos de microorganismos indicadores de la calidad higiénico-sanitaria**

Muestras	Aerobios Mesófilos	Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
QHA1	9,18 <sup>a</sup> ± 0,04	5,67 <sup>a</sup> ± 0,08	1,80 <sup>a</sup> ± 0,06	3,46 <sup>a</sup> ± 0,04
QHA2	8,59 <sup>a</sup> ± 0,10	6,56 <sup>a</sup> ± 0,17	0	3,38 <sup>a</sup> ± 0,07
QHA3	9,35 <sup>a</sup> ± 0,08	6,35 <sup>a</sup> ± 0,10	1,67 <sup>a</sup> ± 0,00	3,41 <sup>a</sup> ± 0,11
QHI1	7,81 <sup>b</sup> ± 0,06	3,64 <sup>b</sup> ± 0,07	0	0
QHI2	7,36 <sup>b</sup> ± 0,03	3,65 <sup>b</sup> ± 0,07	0	0

<sup>a-b</sup> Valores de grupos microbianos en quesos, dentro de una misma columna, que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores expresados en Log UFC/g se presentan como las medias ± la desviación estándar de 3 réplicas procedentes de 2 muestras de queso de hoja artesanal (QHA) o industrial (QHI), que representan a un total de 30 muestras

### 3.2 Recuento de Bacterias ácido lácticas

En la Tabla 2 se muestran los niveles poblacionales de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Lactococcus*) expresados en Log 10 UFC/g en los quesos de hoja de elaboración artesanal e industrial.

**Tabla 2. Niveles de *Lactobacillus* y *Lactococcus***

Muestras	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>
QHA1	9,16 <sup>ax</sup> ± 0,27	9,39 <sup>ax</sup> ± 0,26
QHA2	8,76 <sup>ax</sup> ± 0,09	9,15 <sup>ax</sup> ± 0,34
QHA3	9,35 <sup>ax</sup> ± 0,22	9,41 <sup>ax</sup> ± 0,15
QHI1	7,82 <sup>bx</sup> ± 0,04	8,27 <sup>by</sup> ± 0,04
QHI2	7,06 <sup>bx</sup> ± 0,08	7,70 <sup>by</sup> ± 0,06

<sup>a-b</sup> Valores de grupos microbianos en quesos, dentro de una misma columna, que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

<sup>x-y</sup> Valores de grupos microbianos en quesos, dentro de una misma fila, que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores expresados en Log UFC/g se presentan como las medias ± la desviación estándar de 3 réplicas procedentes de 2 muestras de queso de hoja artesanal (QHA) o industrial (QHI), que representan a un total de 30 muestras

### 3.3 Caracterización metabólica de cepas BAL

Se examinaron 18 aislados en el medio MRS y 14 en el medio M17 incubado en condiciones anaerobias, de los cuales 21 provinieron del queso de hoja artesanal y 11 del industrial. Los aislados de presuntas BAL purificadas, cuyos ensayos de identificación fenotípica les presenta como colonias lenticulares de color blanco, que agrupan bacilos o cocos Gram (+), catalasa (-), oxidasa (-), no móviles, condujeron a la caracterización de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* como parte de la microbiota responsable de la formación del queso de hoja y de sus atributos sensoriales: olor, sabor, flavor y textura.

En la figura 2 se muestran los seis grupos del BAL caracterizados en función de su morfología y su respuesta metabólica frente al crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas, concentración salina, variación de pH y producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa.

Grupo A: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5 % (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (+); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo B: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (+); pH 9.6 (-); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo C: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5 % (-); NaCl 18 % (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo D: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5 % (-); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo E: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (-); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo F: *Lactococcus* s.p Crecimiento a 10°C y 45°C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Recuento de microorganismos indicadores de la calidad higiénico-sanitaria

De manera global, los recuentos de coliformes, *E. coli* y *S. aureus* examinados en los quesos de hoja de elaboración artesanal e industrial superan los límites de aceptabilidad establecidos en la normativa ecuatoriana, sugiriendo pobre calidad higiénica del proceso y/o incorrecta manipulación de la leche como materia prima. Para reducir estos niveles es necesario mejorar la aplicación de las correctas prácticas de higiene tal como lo establecen los programas de HACCP (13).

Por otra parte, se aprecia diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estos microorganismos dependiendo de su origen, los elaborados artesanalmente presentaron los niveles más altos de indicadores, en contraste en los quesos de elaboración industrial hubo ausencia de *S. aureus* y *E. coli* y una reducción de 70 % en coliformes y 19 % en aerobios mesófilos.

La reducción de la microbiota se puede atribuir a que en la elaboración industrial por lo general el control de calidad de la materia prima es riguroso, se aplica tratamiento térmico a la leche cruda, se controla las condiciones higiénico sanitarias del proceso,

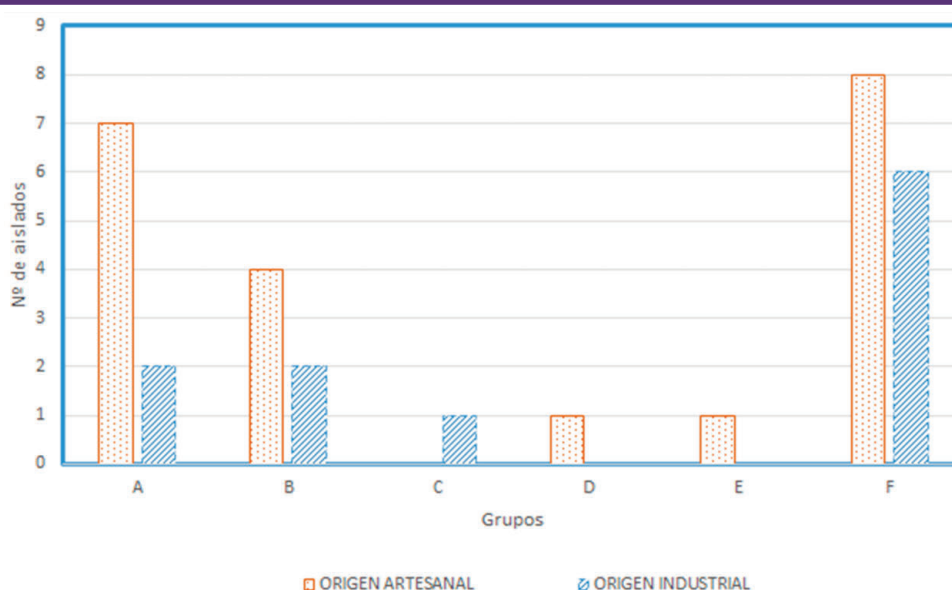


Figura 2. Número de BAL aisladas de quesos artesanales e industriales clasificadas en seis grupos según su morfología y respuesta metabólica.



el grado de manipulación de los operarios es menor, además se debe considerar que el material de empaque usado, bolsas de polietileno de alta densidad, representa un envase aséptico sumado al empackado al vacío, versus hojas de vegetales, un producto natural sin cierre hermético que puede propiciar el ingreso de contaminantes.

El grupo de *aerobios* mesófilos comprende microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que se desarrollan a temperaturas medias, estos representan la totalidad de la carga microbiana cultivable. Su determinación es importante para la calidad y seguridad del queso debido a que existe el riesgo de la presencia de patógenos y microorganismos causantes de la descomposición del producto que sobreviven al calentamiento de la leche o al tratamiento térmico (14).

Su recuento alto en los quesos de hoja artesanales o industriales no necesariamente indican alteración inminente debido a que el queso es un alimento vivo, una matriz que está constantemente en evolución, sin embargo, en el caso de quesos de hoja, dada su naturaleza perecible este indicador si puede asociarse a calidad higiénico-sanitaria y sugerir problemas de higiene o abuso de temperaturas durante el transporte o conservación del producto.

Los coliformes agrupan a especies no categorizadas taxonómicamente, aunque están ampliamente distribuidas en el ambiente, sin embargo, existe un subgrupo cuyo origen es intestinal, siendo *E. coli* la especie más relevante, por la existencia de serotipos patogénicos. En realidad, el grupo coliforme se ha empleado históricamente como indicador de higiene asociado a contaminación fecal, sin embargo, varios estudios han demostrado que la mayoría de coliformes provienen de fuentes ambientales por consiguiente los niveles de coliformes en el queso raramente indicarían contaminación fecal (15), por lo tanto, la presencia de *E. coli* en el queso de hoja depende exclusivamente de las condiciones higiénicas deficitarias durante la producción, por contaminación de la materia prima, superficies inertes (equipos, accesorios, utensilios, pisos, paredes), del aire de la sala de elaboración y a través de los operarios, es decir este grupo puede establecerse en los quesos por contaminación cruzada.

*S. aureus*, es el indicador específico de contaminación a través de los manipuladores y puede transferirse al queso de hoja a partir de la leche contaminada intrínsecamente o de superficies vivas tales como la ubre de la vaca, piel, manos, uñas y cabello de los operadores, con el peligro de que su multiplicación en el queso resulte favorable para la producción de una enterotoxina termorresistente, agente de intoxicación estafilocócica (16). Las superficies inertes también son foco de contaminación y parece que no basta controlar sus niveles con limpieza y desinfección, dada su capacidad de formar biopelículas y resistir a ambientes hostiles (17).

Cabe recalcar que el queso de hoja de cualquier sistema de elaboración es susceptible de adquirir otros microorganismos secundarios mientras se combina con los componentes ambientales, en su recorrido del campo a la mesa, de modo que los indicadores pueden sobrepasar los criterios microbiológicos de aceptación.

En quesería, el paso de la elaboración casera a la producción masiva y tecnificada sin duda resulta en mayores volúmenes de producción, un mejor control en las características físicas, físico-químicas y microbiológicas, involucra además una estandarización de actividades, procesos y productos que puede reflejarse en una mejor calidad higiénica.

Además, es innegable que los quesos tradicionales de hoja, comercializados a pequeña escala pueden ser alimentos muy importantes por su contribución al desarrollo de zonas rurales del país y de su población.

## 4.2. Recuento de bacterias ácido lácticas

En este estudio, la mayoría de *Lactobacillus* son fisiológicamente similares y comparten los mismos requerimientos nutricionales, forman colonias de igual morfología al crecer en el medio de cultivo MRS a pH 5.4, el uso de este medio de cultivo acidificado, promueve el crecimiento únicamente de lactobacilos que toleran niveles de pH más bajos (pH 5.0 – 6.5) que los *Lactococcus* (18).

Los recuentos de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en los quesos de hoja artesanales y de elaboración industrial variaron entre  $7,06 \pm 0,08$  UFC/g y  $9,41 \pm 0,15$  UFC/g, en las muestras examinadas (Tabla 2), estos valores se muestran próximos a los determinados en quesos similares de pasta hilada producidos en otras latitudes, como el queso Oaxaca muy popular en México elaborado artesanalmente con leche cruda, el cual reveló  $9,8 \pm 0,8$  log UFC/g de *Lactobacillus* (19), mientras en el queso artesanal hondureño, se encontraron niveles de BAL entre 1,00 a  $8,95$  log UFC/g, con un promedio general de  $4,76 \pm 1,99$  UFC/g (20).

Los niveles poblaciones de *Lactococcus* y *Lactobacillus* fueron similares en los quesos de hoja artesanal, en el caso de los quesos industriales existe mayor cantidad de *Lactococcus* respecto a *Lactobacillus* (Tabla 2). Este resultado es similar al reportado en el queso fresco de pasta hilada *Fior di latte* elaborado en las regiones del sur de Italia que presentaron un nivel más elevado de cocos frente a bacilos (21).

Adicionalmente, los productos industriales se distinguen de los artesanales por la reducción poblacional de *Lactobacillus* en 18,15 % y *Lactococcus* en 14,27 %. Estas reducciones se atribuyen al efecto de un tratamiento térmico más intenso empleado durante el procesado industrial. En este caso, la tecnificación del proceso de elaboración del queso, aunque significa mejoras en la higiene y conservación del producto, reduce los niveles de BAL, que son las bac-



terias más importantes implicadas en el sabor, aroma y textura del queso. Se sabe que el aroma está dado principalmente por compuestos orgánicos volátiles derivados del metabolismo de la BAL y depende de aspectos tecnológicos específicos de los distintos tipos de queso (22).

### 4.3. Caracterización metabólica de cepas BAL

Las características organolépticas, así como la vida útil y la seguridad del queso, dependen en gran medida de la composición y la evolución de su microbiota (23). En este sentido, algunos estudios centrados en la biodiversidad bacteriana de los quesos de hoja artesanales pueden conducir al desarrollo de cultivos iniciadores y cultivos adjuntos de importancia tecnológica (24), que permitan obtener quesos de hoja industriales con mejores características sensoriales, de ahí que en el presente estudio a partir de un tamizaje rápido y económico se caracterizaron 32 cepas de BAL en función de los atributos de crecimiento y su morfología.

Dichas características permitieron la discriminación en 6 grupos (Figura 2) con base en la similitud de respuestas a los diferentes ensayos. Esta primera clasificación sirve de aproximación a la selección de BAL con características de interés para la industria quesera.

Todos los aislados de los grupos A, B, C, D, E, F, crecieron a temperaturas de 10 °C y 45 °C, algunas especies como *Lactobacillus plantarum* pueden desarrollarse simultáneamente en estos dos valores, sin embargo, en la práctica es poco común encontrar este comportamiento. Los resultados obtenidos en esta investigación contrastan con lo anterior, ya que el 100 % de los aislados crecieron en dichas temperaturas, esto puede atribuirse a que las BAL para responder al estrés por los cambios bruscos de temperatura disponen de un mecanismo adaptativo mediante la activación de proteínas de choque térmico (HSPs) o de proteínas inducidas por el frío (CIP) cuando hay ambientes muy fríos, garantizando así su supervivencia (25).

En cuanto al crecimiento en medio MRS con NaCl, ninguno de los aislados se desarrolló en una concentración salina al 18%, coincidiendo con la mayoría de las BAL que no crecen en este ambiente, excepto *Tetragenococcus* (26). En cambio, los aislados de los grupos A, B, E, F, crecen en NaCl al 6.5 % a diferencia de los aislados en C y D, que no crecen bajo esta condición. En un estudio con varios quesos europeos se detectaron BAL con tolerancia al 7.0 % de NaCl, dato consistente con lo ocurrido en este estudio (27). Sin embargo, las respuestas distintas de halotolerancia pueden explicarse por la biodiversidad (28). De otro lado, la halotolerancia de las cepas analizadas, indica que estas podrían exhibir propiedades tecnológicas y enzimas de interés, no solo para la industria láctea sino para el sector biotecnológico (29). En general, se sabe que la regulación de

los genes inducidos por la presión osmótica afecta al estado fisiológico y a las propiedades de las BAL, también afecta indirectamente a la formación de metabolitos (30).

En relación al pH, varias cepas mostraron variabilidad de crecimiento, según (31) el crecimiento de *Lactobacillus* a pH 4.4 es variable, en este sentido otro estudio (27) caracterizó cepas de BAL de quesos utilizando medios alcalinos pH 9.5; esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio Figura 2.

Ningún grupo presentó producción de CO<sub>2</sub> por fermentación de la glucosa, cumpliendo la característica de las cepas aisladas del queso de hoja que no deberían ser formadoras de gas, rasgo que es característico de algunos quesos madurados como el Gouda (32). La no producción de gas es típica de los bacilos homofermentativos, cuyo principal producto metabólico es el ácido láctico, en cambio las BAL heterofermentativas, además de ácido láctico generan otros compuestos entre los que se encuentran el dióxido de carbono. Sin embargo, de acuerdo al esquema de clasificación general propuesto por (33) solamente el grupo B (6 cepas) se caracteriza como *Lactobacillus*. Los aislados restantes *Lactobacillus* (A, C, D, E) presentan características diferentes pese a que son BAL, por lo que las respuestas a estos ensayos no son concluyentes para la identificación de especie sin embargo se debe destacar la diversidad de bacterias lácticas presentes en el queso de hoja ecuatoriano.

En cuanto a los *Lactococcus* (Grupo F) de acuerdo a (34) presentan las características propias de este género, pudiendo pertenecer a *Enterococcus*. Dentro de las BAL también los géneros *Tetragenococcus* y *Aerococcus*, se desarrollan a pH 9.6.

Aparte de las características descritas para *Enterococcus*: crecimiento a 10 °C y 45 °C, en 6.5 % de NaCl y a pH 9.6, su sobrevivencia después de calentamiento a 60 °C durante 30 minutos asegura la correspondencia a este género, en esta ocasión no se realizó dicho ensayo *in vitro*, sin embargo, se evidencia la tolerancia de aislados de BAL a dicha temperatura ya que durante el procesamiento se realiza el estiramiento de la pasta a 70 °C.

## 5. CONCLUSIONES

La evaluación microbiológica comparativa de los quesos de hoja artesanales e industriales, mediante niveles de indicadores de higiene, superan los límites de aceptabilidad descritos en la normativa ecuatoriana, sugiriendo pobre calidad higiénica de los procesos, del entorno o incorrecta manipulación de la leche; para reducir estos niveles es necesario mejorar la aplicación de las correctas prácticas de higiene tal como lo establecen los programas del sistema HACCP. Adicionalmente la intensidad del tratamiento térmico aplicado afecta a los niveles poblacionales de BAL en los dos tipos de quesos examinados.



El queso de hoja artesanal es potencial fuente de BAL indígenas, a partir de las cuales se pueden preparar cultivos iniciadores y no iniciadores que diversifiquen el flavour y aroma de los quesos elaborados industrialmente.

Sin duda, el queso de hoja elaborado artesanalmente requiere mejoras en el aspecto higiénico e innovación a fin de garantizar su calidad e inocuidad, sin pérdida de sus características sensoriales típicas que lo identifican como un elemento representante de la gastronomía ecuatoriana-española y un atractivo turístico de Latacunga, Ecuador.

## 6. REFERENCIAS

1. Villegas A, Cervantes FE. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estud Soc.* 2011; 38:146–64.
2. Méndez C. Fundamentos químicos y microbiológicos en la fabricación de quesos. In: Editor EC, editor. *Fabricación de quesos en el mundo*. 2018. p. 47–62. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/espochsp/detail.action?docID=5426368&query=el+aboración+de+quesos+en+el+mundo#>
3. McMahon DJ, Oberg CJ. *Pasta-Filata Cheeses*. Fourth Edi. Cheese. Elsevier Ltd; 2017. 1041-1068 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00040-5>
4. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528:2012 Primera revisión. Norma General para quesos frescos no madurados. Requisitos. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.1528.2012/page/n1/mode/2up>.
5. Ministerio de Cultura y Patrimonio. Queso de hoja - Patrimonio Alimentario. 2016. Disponible en: [http://patrimonioalimentario.culturaypatrimonio.gob.ec/wiki/index.php/Queso\\_de\\_hoja](http://patrimonioalimentario.culturaypatrimonio.gob.ec/wiki/index.php/Queso_de_hoja)
6. Vizcarra R, Lasso R, Tapia D. La Leche del Ecuador. CILEC (Centro La Industria Láctea Del Ecuador) 2015;183. Disponible en: [http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/publicaciones/la\\_leche\\_del\\_ecuador.pdf](http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/publicaciones/la_leche_del_ecuador.pdf)
7. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-2: 2013 Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.1529.2.1999/page/n1/mode/2up>
8. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-5:2006. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Disponible en: <https://archive.org/stream/ec.nte.1529.5.2006#page/n1/mode/2up>. AOAC Official Method 991.14: Coliform and Escherichia coli Counts in Foods. Disponible en: <http://www.longrunbio.com/uploads/soft/130814/1-130Q4144244.pdf>.
9. NORMA (PRT-712.02-047): 2010. Recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en yogurt. Procedimiento. Disponible en: <https://studylib.es/doc/4809786/prt-712.02-047-v2-lactobac-y-strept-yogurt>
10. NORMA ISO 16068 :2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - colony-count technique at 30 degrees. Disponible en: [https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/BIS-IS-16068-2013-188443\\_SAIG\\_BIS\\_BIS\\_452132/](https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/BIS-IS-16068-2013-188443_SAIG_BIS_BIS_452132/).
11. Marotta S, Giarratana F, Raffaele G, et al. Industrial and artisanal fresh filled pasta: Quality evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*. J Food Process Preserv 2018; 42:13340 Disponible en : <https://doi.org/10.1111/jfpp.13340>.
12. Arguello P, Lucero O, Castillo G, et al. Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba (Ecuador). *Perspectiva* 2015; 16:65-74.
13. Murphy N, Barbano M, Wiedmann M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J. Dairy Sci.* 2016; 99:10128–10149.
14. Martin N, Trmčić T, Hsieh K, et al. Evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1549.
15. Kümmel J, Stessl B, Gonano M, et al. Staphylococcus aureus entrance into the dairy chain: Tracking S. aureus from dairy cow to cheese. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7:1-11.
16. Gutierrez D, Delgado S, Vazquez-Sanchez D, et al. Incidence of Staphylococcus aureus and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78:8547-8554.
17. Corry J, Curtis G, Baird R, *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. Tercera. The Royal Society Of Chemistry, 2012. ISBN 9781847559166.
18. Castro G, Martínez F, Martínez A, et al. Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 2013; 105–109.
19. Enríquez L, Díaz JJ, Pinto A, et al. Characterization of Microbiota Isolated from Traditional Honduran Cheese. *Journal of Food & Industrial Microbiology* 2016; 2:1-7. DOI 10.4172/2572-4134.1000117. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/characterization-of-microbiota-isolated-from-traditional-honduran-cheese.php?aid=83273>.
20. Coppola S, Fusco V, Andolfi R, et al. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of dairy Research* 2006; 73: 264-272.
21. Bergamaschi M, Bittante G. From milk to cheese: Evolution of flavor



## DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

- fingerprint of milk, cream, curd, whey, ricotta, scotta, and ripened cheese obtained during summer Alpine pasture *J. Dairy Sci.* 2018; 101:3918–3934.
22. Riquelme C, Camara S, De Lurdes M, et al. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int. J. Food Microbiol.* 2015; 192: 86–94. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.03116.
  23. Irlinger F, Mounier J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; 20:142-148.
  24. Doyle, Michael P. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Springer, 2011. ISBN 9780387927701.
  25. Bergey. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second. 2009. ISBN 9780387950419.
  26. Melgar G, Morales F, Rivera Y, et al. Importance of halophilic and halotolerant lactic acid bacteria in Cheeses. In *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems*. Springer, NY 2015; 279-287.
  27. Morales, Fredy, et al. "Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses." *Applied biochemistry and biotechnology* 2011; 164:889-905. DOI 10.1007/s12010-011-91826.
  28. Haastrup, Martin Kragelund, et al. "Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts." *International journal of food microbiology* 2018; 285:173-187.
  29. Wu, W and Zhao N. *Metabolomics of Lactic Acid Bacteria in: Chem W. Lactic acid Bacteria Omics and Functional Evaluation*. Springer Nature Singapore Pte Ltd and Science Press 2019; 167-182. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978\\_981\\_13\\_7822\\_4\\_6](https://doi.org/10.1007/978_981_13_7822_4_6)
  30. Salminen M, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. "Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland." *Clinical infectious diseases* 2002; 35.10: 1155-1160.
  31. McSweeney P, Fox P, Cotter P, Everett D. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth. Elsevier Academic Press 2017. ISBN 9780124170124.
  32. Lahtinen S, Ouwehand A, Salminen S; Wright. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 2012. ISBN 9781439836781.
  33. Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et al. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiology* 2006; 106.1:1–24.

Si desea citar nuestro artículo:  
Ana Karina Albuja Landi; Janneth Gallegos, et al/  
**Evaluación de la calidad microbiológica del queso de hoja tradicional de Ecuador elaborado artesanal e industrialmente**  
An Real Acad Farm [Internet].  
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 2 (2020) · pp. 117 -124  
DOI: <http://>

## ADHERENCIA TERAPÉUTICA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CRÓNICAS DEL CLUB DE ADULTOS MAYORES DE UN CENTRO DE SALUD, ECUADOR

### THERAPEUTIC ADHERENCE IN PATIENTS WITH CHRONIC DISEASES OF THE CLUB OF OLDER ADULTS OF A HEALTH CENTER, ECUADOR

Adriana Carolina Rincón Alarcón<sup>1</sup>, Nancy Ximena Gusñay Ramírez<sup>2</sup> y Valeria Isabel Rodríguez Vinuesa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación de Tecnología y Atención Farmacéutica de Ecuador (GITAFEC). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Farmacéutico, PhD. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Panamericana.

<sup>2</sup>Centro de Salud Tipo C Lizarzaburu, Riobamba, Ecuador. Bioquímica Farmacéutica.

<sup>3</sup>Grupo de Investigación de Tecnología y Atención Farmacéutica de Ecuador (GITAFEC). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Bioquímica Farmacéutica MSc.

\*corresponding author: rinconadri@yahoo.com

#### ORIGINAL

#### RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la determinación de la adherencia terapéutica en pacientes con enfermedades crónicas del club de adultos mayores de un centro de atención primaria de Riobamba - Ecuador, para lo cual participaron 25 pacientes previo consentimiento informado. Se empleó método subjetivo indirecto, basado en cuestionario dirigido a determinar características sociodemográficas de los pacientes, grado de adherencia terapéutica a través del test de Morisky Green y posibles factores influyentes en la adherencia, consideraron las 4 principales dimensiones establecidas por la OMS. Para análisis de resultados se utilizó SPSS-PC 24.5 Windows y niveles de significancia de 0,05 %. Los resultados mostraron un predominio de género femenino (80 %), un promedio de edad de 70,2 años y un grado de instrucción primaria en un 60 % de los pacientes. Se identificó que un 56 % de los pacientes padecían al menos dos enfermedades crónicas, resultando la hipertensión arterial la más prevalente (84 %); y un 64 % de ellos se administraban 2 a 3 medicamentos diarios. Se determinó que el 64 % de los adultos mayores eran inadherentes con el esquema terapéutico prescrito, encontrando que los factores socioeconómicos incidieron de manera totalitaria sobre los pacientes en estudio. Los factores relacionados con el equipo de salud, la terapia y los inherentes al paciente, incidieron en la adherencia terapéutica en menor proporción. La insuficiencia económica para costear los medicamentos y las dietas de elevado costo prescritas, resultó ser la variable con mayor impacto en la inadherencia terapéutica, encontrando relación directa con el grado de instrucción primaria que tenían mayoritariamente los pacientes en estudio. Además, todas las variables reportadas en el estudio como causas de la inadherencia al tratamiento exigen direccionar acciones orientadas a afianzar un sistema sanitario basado en la promoción y prevención de salud, a fin de aumentar la calidad de vida de los pacientes.

#### ABSTRACT

*The objective of this investigation was the determination of therapeutic adherence in patients with chronic diseases of the club of older adults of a primary care center in Riobamba-Ecuador, for which 25 patients participated with prior informed consent. An indirect subjective method was used, based on a questionnaire aimed at determining the sociodemographic characteristics of the patients, degree of therapeutic adherence through the Morisky Green test and possible influencing factors on adherence, considered the 4 main dimensions established by the WHO.*

*SPSS-PC 24.5 for Windows and significance levels of 0.05 % were used for results analysis. The results showed a predominance of female gender (80 %), an average age of 70.2 years and a degree of primary education in 60 % of the patients. It was identified that 56 % of the patients suffered from at least two chronic diseases, with hypertension being the most prevalent (84 %); and 64 % of them administered 2 to 3 medications daily. It was determined that 64 % of older adults were inadherent with the prescribed therapeutic scheme, finding that socioeconomic factors had a total impact on the study patients. Factors related to the health team, therapy, and those inherent to the patient, influenced therapeutic adherence in a lesser proportion. The economic insufficiency to pay for the medications and the high-cost diets prescribed, turned out to be the variable with the greatest impact on therapeutic non-adherence, finding a direct relationship with the degree of primary education that the study patients had mostly. In addition, all the variables reported in the study as causes of non-adherence to treatment require directing actions aimed at strengthening a health system based on health promotion and prevention, in order to increase the quality of life of patients.*

#### Palabras Clave:

Adherencia terapéutica  
Enfermedades crónicas no transmisibles  
Test Morisky Green

#### Keywords:

Therapeutic adherence  
Chronic noncommunicable diseases  
Morisky Green test



## 1. INTRODUCCIÓN

La falta de adherencia a los tratamientos farmacológicos en enfermedades crónicas es un problema a nivel mundial que afecta la efectividad de los medicamentos, generando resultados negativos en la salud del paciente y un impacto en el gasto sanitario (1). Una inadecuada adherencia al tratamiento implica un peor control de la enfermedad, aumento en la estancia hospitalaria, visitas a urgencias, pruebas complementarias y la utilización de otros fármacos, aumentando la probabilidad de aparición de resistencia a los mismos (2).

Según la OMS, la falta de adherencia al tratamiento en enfermedades crónicas implica un problema de salud pública de grandes dimensiones en todas las áreas de salud, ya que a nivel mundial estas van en aumento con elevadas tasas de fracaso y baja adherencia al tratamiento, constituyéndose en una de las principales causas de invalidez y muerte prematura (3).

El inadecuado cumplimiento del tratamiento está muy extendido, calculándose que aproximadamente el 50 % de las medicaciones para enfermedades crónicas no transmisibles como hipertensión, dislipidemias, diabetes, entre otras, no se administran o lo hacen en forma errónea, teniendo como resultado un problema de gran magnitud, si se tiene en cuenta que alrededor del 5 % de la población padece de enfermedades crónicas que no generan síntomas de forma inmediata, sino a largo plazo (4).

La Organización Panamericana de Salud (3) indica que entre el 30 y el 50 % de los adultos mayores no siguen correctamente la prescripción médica y más del 90 % toman dosis inferiores de las prescritas por el médico. De igual manera en Madrid, el Observatorio de la Adherencia al Tratamiento (5) estimó que la falta de adherencia en atención primaria alcanzaba el 57 %, y los pacientes polimedicados eran los que menos cumplían el tratamiento, debido a que lo abandonaban, desconocían la gravedad de la enfermedad o carecían de síntomas, entre otras complicaciones. Resulta evidente la importancia de la identificación de los pacientes incumplidores, por lo que a través del tiempo se han encontrado y validado métodos que permiten estimar en la práctica clínica el cumplimiento terapéutico en diferentes enfermedades, siendo uno de ellos el Test de Morisky-Green, muy empleado en la valoración de actitudes acerca del tratamiento en enfermedades crónicas, presentando además la ventaja de proporcionar información sobre las causas del incumplimiento (1) (6).

Algunos estudios refieren que el mal uso de los medicamentos por parte del paciente es debido en muchas ocasiones al desconocimiento de estos, generalmente a causa de falta de información o de comprensión, mala interpretación u olvido de las instrucciones recibidas; por lo que el no entender el modo de utilizarlos conlleva al abandono del tratamiento (7).

Según el Grupo de Trabajo en Fármacos de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (SemFYC), existen variables relacionadas con el paciente, con la enfermedad que padece, con el sistema sanitario y con el propio tratamiento (8).

Es así como el aumento del envejecimiento poblacional, las enfermedades crónicas y los pacientes polimedicados son factores fundamentales que impactan en la disminución de la adherencia a los tratamientos; por lo que evaluar las causas que influyen en este tipo de pacientes desde el inicio del tratamiento y durante el tiempo necesario es de vital importancia (9).

Todos estos antecedentes condujeron al objetivo de esta investigación que fue la determinación de la adherencia terapéutica en adultos mayores con patologías crónicas, a fin de aportar datos referenciales en nuestro país que permitan generar planes estratégicos dirigidos a la reducción de la inadherencia terapéutica, de manera específica en este grupo de pacientes.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó la adherencia terapéutica en 25 pacientes diagnosticados con enfermedades crónicas y partícipes del club de adultos mayores de un Centro de Atención Primaria de Salud de Riobamba - Ecuador, que previo a un consentimiento informado accedieron a contribuir con el estudio. Para la recolección de la información, se empleó el método subjetivo indirecto, por lo que se aplicó un cuestionario dividido en tres partes; la primera sección contenía interrogantes dirigidas a determinar las características sociodemográficas de los pacientes, como la edad, género, escolaridad, tipos de enfermedades crónicas, tiempo de evolución de la enfermedad y la cantidad de medicamentos que consumían. La segunda sección evaluaba el grado de adherencia terapéutica a través del test de *Morisky Green*, cuestionario conformado por cuatro preguntas con respuesta dicotómica (sí/no) y empleado para valorar actitudes inherentes al cumplimiento del tratamiento de la enfermedad del paciente, al permitir identificar la condición de incumplidor, cuando las respuestas se ajustan al orden (no/sí/no/no) (10). Finalmente, la tercera parte de la encuesta se centró en indagar los posibles factores influyentes en la adherencia a los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, por lo que se consideraron las 4 principales dimensiones establecidas por la OMS, que a saber son: los factores socioeconómicos, los relacionados con el equipo de salud, los conexos con la terapia y los inherentes al paciente (11). Para esta última parte de la encuesta, se utilizó un cuestionario diseñado y validado por Bonilla y Gutiérrez (12).

Para el procesamiento de los resultados obtenidos, se utilizó el paquete estadístico SPSS-PC 24.5 para Windows. Los niveles de



significancia fueron establecidos en el 0,05 % con intervalos de confianza del 95 %.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio aplicado a los 25 pacientes del club del adulto mayor, arrojaron resultados de las variables sociodemográficas, que mostraron un predominio con 80 % de género femenino y un promedio de edad de 70,2 años, tal como se evidencia en la tabla 1.

Con respecto al grado de instrucción, el 60 % de los adultos mayores aseguraron haber culminado la instrucción primaria, el 28 % la secundaria y el 12 % no haber asistido a ningún centro educacional. Estos datos no mostraron significación estadística, sin embargo, ciertos autores manifiestan que el bajo nivel de escolaridad influye de manera significativa en la adherencia terapéutica, pues los pacientes con menor instrucción académica no comprenden correctamente las indicaciones recomendadas por el médico, lo que dificulta el cumplimiento de las dosis terapéuticas, propiciando el abandono de la terapia farmacológica (13).

En cuanto al sistema de apoyo al paciente, se identificó que el 56 % de los adultos mayores vivían con sus hijos, el 36 % con su cónyuge y el 8 % vivían solos, siendo este un aspecto fundamental, pues se considera que la convivencia familiar es uno de los factores de mayor relevancia, al constituir un elemento de motivación al paciente para mantener una adecuada adherencia terapéutica (14). Por otra parte, se considera que los pacientes que viven solos tienen mayor dificultad en el manejo de sus medicamentos, por ende, existe mayor riesgo de abandono del tratamiento (15).

El tiempo de evolución de la enfermedad con mayor incidencia en la muestra estudiada, fue entre 5 y 10 años (36 %), seguido del período de 1 a 4 años (32 %). Este aspecto en algunos casos es señalado de forma contradictoria debido a que puede ser un elemento que constituya un incentivo, teniendo en cuenta la evolución satisfactoria de la enfermedad, mientras que en otros casos puede generar el incumplimiento de la terapia, a causa de la permanencia de la administración de fármacos (14).

Con relación a los medicamentos de administración diaria, el 64 % de los pacientes afirmaron administrarse de 2 a 3 medicamentos y el 28 % más de 3 medicamentos al día. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos, sin embargo, la polimedización es una problemática conexas a la tercera edad, pues investigaciones realizadas indican que el uso de dos fármacos conlleva a que se presenten eventos adversos relacionados con la medicación en un 13 %, pero con cinco aumentaría al 58 % y si se emplean más de siete medicamentos la incidencia puede llegar al 82 %; provocando consecuencias graves e interacciones entre fármacos (16).

**Tabla 1: Caracterización de la población a través de las variables sociodemográficas**

CARACTERÍSTICAS	n	PORCENTAJE
<b>GRUPO ETARIO</b> (años)		
65-70	13	52
71-75	9	36
>75	3	12
<b>GÉNERO</b>		
Masculino	5	20
Femenino	20	80
<b>INSTRUCCIÓN</b>		
Primaria 15	60	
Secundaria 7	28	
Superior 0	0	
Ninguno 3	12	
<b>SISTEMA DE APOYO</b> (CONVIVENCIA FAMILIAR)		
Solo	2	8
Esposo/a	9	36
Hijos	14	56
<b>TIEMPO DE EVOLUCIÓN</b> <b>DE ENFERMEDAD (años)</b>		
< 1	2	8
1 - 4	8	32
5 - 10	9	36
> 10	6	24
<b>MEDICAMENTOS</b> <b>DE ADMINISTRACIÓN</b> <b>DIARIA</b>		
1	2	8
2 - 3	16	64
> 3	7	28

De igual manera, se determinaron en los pacientes el número y tipo de Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT), obteniéndose que el 56 % presentaban al menos dos ECNT, siendo la Hipertensión Arterial (HTA) la de mayor prevalencia (84 %), cifra que corresponde a un resultado estadísticamente significativo. Por otra parte, la Diabetes Mellitus (DM) y el hipotiroidismo se presentaron en un 40 % y 28 % respectivamente, mientras que las de menor incidencia resultaron ser la artritis reumatoidea y la hipertrigliceridemia, datos que no arrojaron significancia estadística. Cabe destacar que estos resultados explican la administración de dos o más medicamentos al día por parte de los pacientes.



En cuanto a la evaluación del grado de adherencia terapéutica a través del test de Morisky Green, se determinó que el 64 % de los adultos mayores no eran adherentes con el esquema terapéutico prescrito para su enfermedad, mientras que el 36 % de ellos mantenía una adherencia adecuada al tratamiento, tal como se observa en la figura 1.

Los resultados obtenidos coinciden con la tendencia actual, encaminada hacia la disminución de la adherencia terapéutica en los pacientes con ECNT. Una investigación realizada en pacientes hipertensos y diabéticos en el año 2015 mostró que solo el 9,8 % de los pacientes pudieron ser considerados como adherentes terapéuticos (17). Otro estudio en Paraguay en el año 2017 concluyó que más de la mitad de los pacientes diabéticos e hipertensos no mostraban una adecuada adherencia al tratamiento farmacológico impuesto por el personal médico (18).

Todos estos datos se consideran alarmantes si se tiene en cuenta que la adherencia al tratamiento constituye el elemento de mayor relevancia en el control de las ECNT y, por tanto, en la disminución de complicaciones y mortalidad causada por este concepto (15).

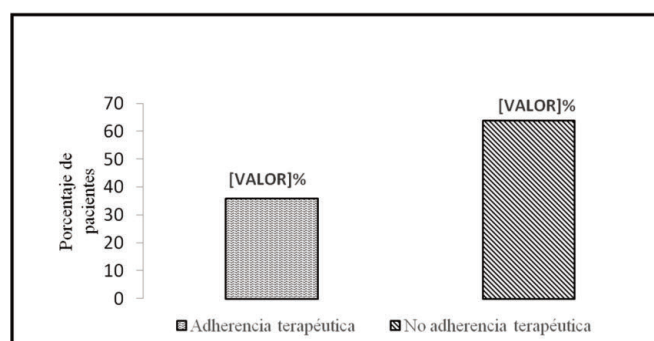


Figura1: Porcentaje de adherencia terapéutica en pacientes según test Morisky Green

El último y tercer componente de la encuesta, relacionado con los factores implicados en la adherencia terapéutica, fue aplicado solo a 16 pacientes que por los resultados anteriores fueron considerados inadherentes, obteniéndose datos que permitieron determinar la influencia de cada una de las cuatro dimensiones, establecidas por la OMS para la adherencia terapéutica, tal como se muestra en la tabla 2.

Al realizar el análisis de los distintos factores que influyeron en la adherencia terapéutica de los adultos mayores incluidos en esta investigación, se pudo comprobar que los socioeconómicos incidieron de manera totalitaria sobre los pacientes en estudio, coincidiendo estos resultados con otras investigaciones que reportan a este tipo de factores, como los de mayor incidencia en el no cumplimiento de las indicaciones médicas (19).

De igual manera, existen investigaciones que reportan

elevados porcentajes de influencia del equipo de salud en la adherencia al tratamiento para enfermedades tanto agudas como crónicas, es así como se ha demostrado que la existencia de una comunicación eficaz, una actitud positiva y la disponibilidad y calidad en el servicio prestado, son determinantes de la adherencia de los pacientes (20).

Por su parte, los factores relacionados a la terapia se han descritos como incisivos en la inadherencia de pacientes que se encuentran en régimen activo con relación a su actividad laboral, sin embargo, no han sido señalados con tanta importancia en adultos mayores (7).

Con respecto a los factores relacionados al paciente, se observa que solo incidieron negativamente en la adherencia terapéutica de 4 adultos mayores (25 %), resultado que fue estadísticamente significativo. Al igual que en otros reportes internacionales, este tipo de factor se presentó con menor frecuencia que, sin embargo, no lo exime de importancia, ya que afecta la adherencia terapéutica de estos pacientes, los cuales, al presentar una ECNT, se encuentran predispuestos a padecer un sinnúmero de complicaciones que pueden poner en peligro su vida (21).

Tabla 2: Porcentaje de pacientes afectados por factores influyentes en la adherencia terapéutica

DIMENSIÓN CON INFLUENCIA SOBRE LA ADHERENCIA TERAPÉUTICA	n	PORCENTAJE DE PACIENTES AFECTADOS
Factores socioeconómicos	16	100
Factores relacionados con el equipo de salud	13	81,25
Factores relacionados con la terapia	14	87,50
Factores relacionados con el paciente	4	25

Por último, se evaluaron las variables relacionadas para cada dimensión o factor, representando en la figura 2, solo el resultado referente a la causa que, según la población encuestada, influía en su inadherencia con mayor incidencia.

Así, se observa que el 81,25 % de los encuestados refirieron dificultades con la suficiencia económica, para adquirir los medicamentos y costear alimentos especiales, lo que imposibilitaba adherirse al régimen dietético, indicado por el personal de salud. Estos datos reportaron significancia estadística, y se justifican porque en su mayoría los adultos mayores no cuentan con los recursos necesarios para solventar gastos relacionados con las necesidades básicas, puesto que al no percibir ingresos mensuales están a merced



de la ayuda de familiares, priorizando otros aspectos antes que los medicamentos (22). Por otra parte, autores reflejan la importancia que tiene el apoyo familiar y social como soporte para el paciente, tanto en lo emocional como en lo económico, aspectos que facilitan una adecuada continuidad en el tratamiento y en las recomendaciones que debe seguir; por lo tanto, se constituye en un factor fundamental en el logro de las metas terapéuticas (23).

Con respecto a los factores relacionados al equipo de salud, los pacientes reportaron como elemento de mayor incidencia (75,0 %), una inadecuada información relacionada con el ajuste de horarios para administrar los medicamentos, según las actividades diarias que realizan. Existen reportes que señalan esta dificultad como el factor de mayor frecuencia dentro de los relacionados con el equipo de salud, debiendo existir una correcta interrelación médico-paciente para garantizar confianza y credibilidad hacia el esquema terapéutico utilizado para el control de su enfermedad (24).

Dentro de los factores relacionados con la terapia, las ocupaciones personales correspondieron al elemento con mayor impacto en la adherencia terapéutica, pudiendo estar relacionado con los hábitos y costumbres de los pacientes. De igual manera, se obtuvo que solo el 25,0 % de los pacientes atribuían su inadherencia al desconocimiento de la importancia en la continuidad del tratamiento, resultado que refleja la necesidad de educar a la población, a fin de crear un sistema sanitario basado en la promoción y prevención de salud que permita el aumento de la calidad de vida, a través de diversas herramientas de atención farmacéutica, como la adherencia terapéutica.

#### 4. CONCLUSIONES

La Hipertensión Arterial (HTA) resultó ser la ECNT de mayor prevalencia (84 %) entre los pacientes del club de adultos mayores sometidos al estudio, quienes en un 56 % aseguraron presentar al menos dos ECNT, lo que justificó que el 64 % de estos pacientes reportaran administrarse diariamente entre 2 y 3 medicamentos. Se evidenció a través del test de Morisky Green que el 64 % de estos pacientes con enfermedades crónicas eran inadherentes, con respecto a los esquemas terapéuticos que sostenían para su patología, resultados que coinciden con la tendencia actual, encaminada hacia la disminución de la adherencia terapéutica en los pacientes con ECNT, considerándose, además, alarmantes al constituir la adherencia al tratamiento el elemento de mayor relevancia en el control de este tipo de patologías y, por tanto, en la disminución de complicaciones y mortalidad causada por este concepto.

El factor socioeconómico resultó ser el de mayor incidencia en la totalidad de los pacientes inadherentes, constituyendo la variable más reportada como causante de la inadherencia la insuficiencia económica para costear los medicamentos y las dietas de elevado costo prescritas. Estos resultados se relacionan directamente con el grado de instrucción primaria que afirmaron alcanzar la mayoría (60 %) de los adultos mayores del estudio, lo que no les permitía contar con recursos necesarios para solventar gastos relacionados con las necesidades básicas. De igual manera, se identificó que el 56 % de los adultos mayores vivían con sus hijos y, a pesar de que el apoyo familiar facilita la adecuada continuidad en el tratamiento y en las recomendaciones a seguirse, en el estudio se consiguió un alto porcentaje (64 %) de inadherencia.

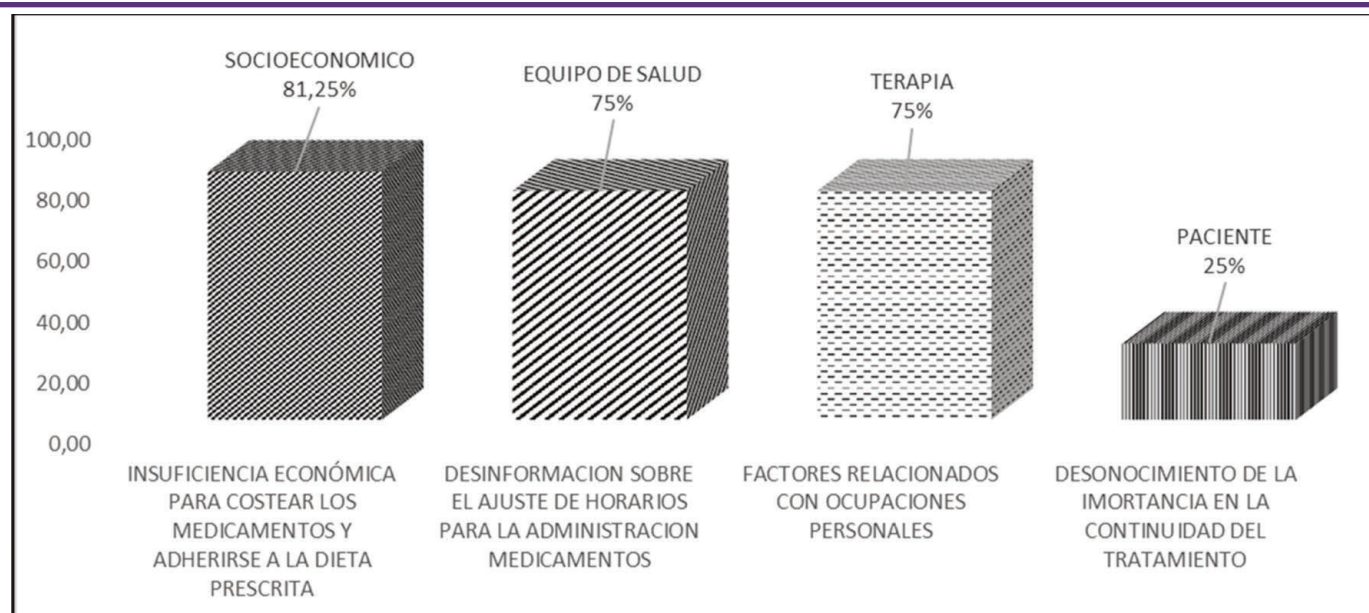


Figura 2: Variables con mayor incidencia reportada para cada dimensión responsable de la inadherencia terapéutica



Finalmente, los pacientes en un 75,0 % reportaron como otro elemento de importante incidencia la inadecuada información relacionada con el ajuste de horarios para administrar los medicamentos, según las actividades diarias que realizaban, y un 25,0 % atribuían su inadherencia al desconocimiento de la importancia en la continuidad del tratamiento. Estos resultados exigen direccionar acciones conducentes a la mejora de la interrelación médico-paciente que garanticen confianza y credibilidad hacia el esquema terapéutico empleado en el control de enfermedades y, además, implementar herramientas educativas fundamentadas en la adherencia terapéutica, a fin de alcanzar un sistema sanitario basado en la promoción y prevención de salud que permita el aumento de la calidad de vida de los pacientes.

## 5. REFERENCIAS

1. Ibarra O, Morillo R, Eds. Lo que debes sobre la adherencia al tratamiento. España: Barcelona 2017.
2. Arnal R, et al. Adherencia al tratamiento en la infección por VIH. Análisis y modificación de conducta 2000; 26, 109: 689-718.
3. Adherencia al tratamiento en enfermedades crónicas. página de inicio de Internet. Organización Panamericana de Salud (OMS). 2016. Disponible en: [https://www.paho.org/ict4health/index.php?option=com\\_kunena&view=topic&catid=21&id=290&Itemid=123&lang=en](https://www.paho.org/ict4health/index.php?option=com_kunena&view=topic&catid=21&id=290&Itemid=123&lang=en)
4. Conthe P, et al. Adherencia terapéutica en la enfermedad crónica: estado de la situación y perspectiva de futuro. Revista clínica española 2014; 214, 6: 336-44.
5. Las tasas de adherencia al tratamiento de los madrileños son del 57,8 %. página de inicio de Internet. Observatorio de la Adherencia al Tratamiento (Grupo OAT) 2018. Disponible en: <https://www.diariofarma.com/2018/04/19/las-tasas-adherencia-al-tratamiento-los-madrilenos-del-578>
6. Limaylla M, et al. Métodos indirectos de valoración del cumplimiento terapéutico. Ciencia e investigación 2016; 19, 2: 95-101.
7. Rojas A, et al. Adherencia terapéutica en pacientes con enfermedades crónicas del Hospital Regional Docente Clínico Quirúrgico Daniel Alcides Carrión — Huancayo, tesis en internet 2016. Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt. Disponible en: <http://repositorio.urosevelt.edu.pe/xmlui/handle/ROOSEVELT/35>
8. La adherencia al tratamiento: un reto para administraciones, profesionales y pacientes. (página de inicio de Internet). Madrid, España: Compromiso Empresarial. 2017. Disponible en: <https://www.compromisoempresarial.com/rsc/2017/09/la-adherencia-al-tratamiento-un-reto-para-administraciones-profesionales-y-pacientes/>
9. Análisis de Adherencia: Visión de la Enfermería. página de inicio de Internet. Observatorio de la Adherencia al Tratamiento (Grupo OAT) 2019. Disponible en: <https://www.oatobservatorio.com/wp-content/uploads/2019/11/03.PPT-Encarna-Fern%C3%A1ndez.pdf>
10. Jaramillo S. Factores que influyen en la adherencia terapéutica en pacientes con hipertensión arterial atendidos en el Centro de Salud de Malacatos, tesis en internet 2017. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/19504/1/TE%20FINAL%20Silvana%20Jaramillo.pdf>
11. Sabaté E, eds. Adherence to long-term therapies: evidence for action. World Health Organization, 2003. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42682/9241545992.pdf>
12. Bonilla C, Gutiérrez de Reales E. Desarrollo y características psicométricas del instrumento para evaluar los factores que influyen en la adherencia a tratamientos farmacológicos y no farmacológicos en personas con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Avances en Enfermería 2014; 32,1: 53-62.
13. Agámez AP, et al. Factores relacionados con la no adherencia al tratamiento antihipertensivo. AMC 2008; 12 (5).
14. Olvera A, et al. Adherencia terapéutica y funcionalidad familiar en personas con hipertensión arterial. Biblioteca Lascasas 2014; 10(2): 26.
15. Sánchez O. Estrategias para mejorar la adherencia terapéutica en patologías crónicas. Inf Ter del Sist Nac Salud Estrategias 2013; 29(2): 40-8.
16. Gavilan E, et al. Ancianos frágiles polimedicados. Rev Esp Geriatr Gerontol 2012; 47(4): 162-7.
17. Rodríguez MR, et al. Prevalencia y factores asociados a la adherencia al tratamiento no farmacológico en pacientes con hipertensión y diabetes en servicios de baja complejidad. Revista Facultad Nacional de Salud Pública 2015; 33,2: 192-199.
18. Ríos C. Adherencia al tratamiento farmacológico en hipertensos y diabéticos de una Unidad de Salud Familiar de Paraguay. Rev Cubana de salud Pública 2018; 44(3): 12-81.
19. Martín Alfonso L, Grau Ábalo JA, Espinosa Brito AD. Marco conceptual para la evaluación y mejora de la adherencia a los tratamientos médicos en enfermedades crónicas. Rev Cubana Salud Pública 2014;40(2).
20. Arce R, et al. Adherencia al tratamiento terapéutico en pacientes con enfermedad de Chagas del Estado de Morelos. Revista biomédica 2017; 28(1): 1.
21. Chacón J, et al. Evaluación del control de la presión arterial y la adherencia terapéutica en hipertensos seguidos en el Programa de Salud Cardiovascular (PSCV): Asociación con características clínicas, socioeconómicas y psicosociales. Rev Chil Cardiol 2015; 34(1): 18-27.
22. Denegri MC, et al. Bienestar subjetivo y patrones de alimentación en



adultos chilenos: un estudio cualitativo. Rev Mex de trastor aliment 2016; 7(2): 105-15.

23. Pisano González MM, González Pisano A. La modificación de los hábitos y la adherencia terapéutica, clave para el control de la enfermedad crónica. Enferm Clin 2014;24(1): 59-66.
24. Sandoval D, et al. Influencia de factores psicosociales en la adherencia al tratamiento farmacológico antihipertensivo. Resultados de una cohorte del Programa de Salud. 2017; 37-46.

## 6. MATERIAL COMPLEMENTARIO

### Encuesta aplicada a los pacientes del club del adulto mayor

#### ENCUESTA PARA LA EVALUACIÓN DE ADHERENCIA TERAPÉUTICA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CRÓNICAS DEL CLUB DE ADULTOS MAYORES DEL CENTRO DE SALUD TIPO C ESPOCH- LIZARZABURU.

Estimado paciente:

La finalidad de la encuesta es conocer la adherencia a los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. A continuación encuentra usted una serie de preguntas que permite determinar si usted cumple o no con su tratamiento recomendado lo que contribuirá a que sea más eficiente. La información que usted aporte es confidencial y se usará solo para fines del estudio. Muchas gracias por su participación.

IDENTIFICACIÓN	Nº de historia clínica	Edad:	Genero:	Ocupación:
----------------	------------------------	-------	---------	------------

Por favor puede marcar con una (X) la opción que considere correcta.

I. INFORMACIÓN GENERAL	<ul style="list-style-type: none"> <li>EL nivel de estudios que usted posee es:                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Primaria</li> <li><input type="radio"/> Secundaria</li> <li><input type="radio"/> Superior</li> <li><input type="radio"/> Ninguno</li> </ul> </li> <li>Usted vive con :                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Esposo /a</li> <li><input type="radio"/> Hijos</li> <li><input type="radio"/> Nietos</li> <li><input type="radio"/> Solo</li> </ul> </li> <li>El tipo de enfermedad usted padece es: (puede indicar más de una opción)                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Hipertensión arterial</li> <li><input type="radio"/> Diabetes</li> <li><input type="radio"/> Hipotiroidismo</li> <li><input type="radio"/> Hipertiroidismo</li> <li><input type="radio"/> Hipertrigliceridemia</li> <li><input type="radio"/> Artritis reumatoide</li> </ul> </li> <li>Podría indicar hace cuánto tiempo aproximadamente le diagnosticaron su enfermedad:                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Menos de 1 año</li> <li><input type="radio"/> Entre 1-4 años</li> <li><input type="radio"/> Entre 5-10 años</li> <li><input type="radio"/> Hace más de 10 años</li> </ul> </li> <li>Podría indicar el o los medicamentos que usted toma:                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Losartán</li> <li><input type="radio"/> Enalapril</li> <li><input type="radio"/> Clortalidona</li> <li><input type="radio"/> Genfibrozilo</li> <li><input type="radio"/> Alopurinol</li> <li><input type="radio"/> Ácido acetilsalicílico</li> <li><input type="radio"/> Metformina</li> <li><input type="radio"/> Amlodipino</li> <li><input type="radio"/> Insulina NPH</li> <li><input type="radio"/> Levotiroxina</li> <li><input type="radio"/> Metotrexato</li> <li><input type="radio"/> Prednisona</li> <li><input type="radio"/> Calcio</li> <li><input type="radio"/> Ácido fólico</li> <li><input type="radio"/> Otros _____</li> </ul> </li> <li>Podría indicar cuantos medicamentos usted toma a diario                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Uno</li> <li><input type="radio"/> Dos</li> <li><input type="radio"/> Tres</li> <li><input type="radio"/> Cuatro o mas</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>¿Olvida alguna vez tomar los medicamentos para tratar su enfermedad?                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Sí</li> <li><input type="radio"/> No</li> </ul> </li> <li>¿Toma los medicamentos a las horas indicadas?                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Sí</li> <li><input type="radio"/> No</li> </ul> </li> <li>¿Cuándo mejoran sus síntomas, usted deja de tomar la medicación?                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Sí</li> <li><input type="radio"/> No</li> </ul> </li> <li>¿Si alguna vez le sienta mal, ¿deja usted de tomar el medicamento?                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Sí</li> <li><input type="radio"/> No</li> </ul> </li> </ul>
II. GRADO DE ADHERENCIA TERAPÉUTICA	

III FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ADHERENCIA A LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS Y NO FARMACOLÓGICOS	I Dimensión Factores socioeconómicos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Su familia tiene los recursos para atender las necesidades básicas, como alimentación, salud, vivienda y educación.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Usted puede costearse los medicamentos.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Usted cuenta con los recursos económicos para trasladarse al lugar de la consulta médica.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>*El alto costo de los alimentos recomendados por el médico le dificulta realizar el cambio en su dieta.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Usted se siente en la capacidad total para poder leer y comprender las indicaciones escritas por el médico sobre el manejo de su enfermedad                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Para cumplir con su tratamiento, usted cuenta con el apoyo de su familia o personas allegadas.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> </ul>
	II Dimensión Factores relacionados con el proveedor: sistema y equipo de salud.	<ul style="list-style-type: none"> <li>El personal de salud que a usted lo atiende responde a sus inquietudes y dificultades con respecto a su tratamiento.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Usted se puede dar cuenta si el médico controla su tratamiento por las preguntas que le hace.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Recibe información sobre las ventajas que tiene los medicamentos ordenados por su médico para su enfermedad.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Recibe información sobre la forma de ajustar los horarios para la toma de los medicamentos, de acuerdo con sus actividades diarias.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>En el caso que usted fallara a su tratamiento, su médico y bioquímico farmacéutico entenderían sus motivos.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>El médico le explica su enfermedad y tratamiento con palabras claras que usted o su familia puedan entender.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Le han explicado los resultados que va a tener en su salud con el tratamiento que se le está aplicando.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Coincide usted con su médico en la esperanza de mejoría, con el tratamiento y los cambios que está haciendo en sus hábitos.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> </ul>
	III Dimensión Factores relacionados con la adherencia.	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Las diversas ocupaciones que tiene dentro y fuera del hogar le dificultan seguir el tratamiento.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>*Las distancias de su casa o trabajo a los consultorios, le dificultan el cumplimiento de sus citas.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>*Tiene dudas acerca de la manera de tomar sus medicamentos, en cuanto a la cantidad, los horarios y la relación con las comidas.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>*Cree que hay costumbres difíciles de cambiar con respecto a la alimentación y ejercicios.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> </ul>
	IV Dimensión Factores relacionados con el paciente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cree que es importante seguir su tratamiento para mejorar su salud.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Esta convencido que el tratamiento es beneficioso y por eso sigue tomándolo.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Se interesa por conocer sobre su estado de salud y la forma de cuidarse.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> <li>Cree usted que es el responsable de seguir el cuidado de su salud.                             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Nunca</li> <li><input type="radio"/> A veces</li> <li><input type="radio"/> Siempre</li> </ul> </li> </ul>

### DECLARACION DE TRANSPARENCIA.

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Si desea citar nuestro artículo:  
Adriana C. Rincón , Nancy X. Gushay y Valeria I. Rodríguez  
**Adherencia terapéutica en pacientes con enfermedades crónicas del club de adultos mayores de un centro de salud, Ecuador**

An Real Acad Farm [Internet].  
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 2 (2020) · pp. 125 -131  
DOI: http://



# QUIMIOTERAPIA NANOMÉTRICA A BASE DE CANNABINOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES GINECOLÓGICOS

## CANNABINOID BASED CHEMO-NANOTHERAPY FOR THE TREATMENT OF GYNECOLOGICAL MALIGNANCIES

Ana Isabel Fraguas Sánchez<sup>1\*</sup>, Ana Isabel Torres Suárez<sup>2</sup>, Ana Fernández Carballido<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, PI Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup>Instituto de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, PI Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, España.

\* corresponding author: anaisabelfraguas@gmail.com

### ORIGINAL

#### RESUMEN

El cannabidiol está despertando un creciente interés como agente antitumoral. Sin embargo, no se ha estudiado su efecto en cáncer de ovario, uno de los tumores más agresivos en mujeres. En el presente trabajo se ha evaluado, por primera vez, el potencial uso del cannabidiol en solución y encapsulado en nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico en cáncer de ovario, ya que estos tumores sobreexpresan los receptores de ácido fólico, permitiendo una acumulación selectiva de estas nanoformulaciones en las células tumorales. El cannabidiol en solución inhibe la proliferación y migración de las células SKOV-3. En terapia de combinación, aumenta significativamente la eficacia antitumoral del paclitaxel, presentando un efecto sensibilizador y sinérgico. En los modelos *in ovo*, la administración previa de cannabidiol en solución seguido de su coadministración con paclitaxel muestra un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral significativamente superior al paclitaxel en monoterapia. Las nanopartículas desarrolladas son eficazmente internalizadas por las células SKOV-3, presentando las nanopartículas con ácido fólico una captación más rápida. Aunque en los estudios de eficacia antitumoral *in vitro* las nanopartículas funcionalizadas no presentan una actividad antiproliferativa superior al cannabidiol en solución o a las nanopartículas no funcionalizadas, en los modelos *in ovo* su eficacia antitumoral es significativamente superior, indicando que el desarrollo de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico es una buena estrategia para vectorizar el cannabidiol a tumores de ovario. Por último, las nanopartículas de cannabidiol potencian el efecto antitumoral del paclitaxel, presentando las formulaciones funcionalizadas con ácido fólico una mayor eficacia que el cannabidiol en solución.

#### ABSTRACT

*Cannabidiol has become in a potential anticancer agent. Nevertheless, it has not been evaluated in ovarian cancer, one of the most aggressive tumors in women. In this work, the potential use of cannabidiol in solution and encapsulated into polymeric nanoparticles coated with folic acid was evaluated for the first time for the treatment of ovarian cancer. Ovarian tumors over-express folic acid receptors and folic-acid-coated nanoformulations trend to be selectively accumulated at tumor site. Cannabidiol in solution administered as monotherapy inhibits the proliferation and migration of SKOV-3 cells. In combination therapy, it significantly increases the antitumor efficacy of paclitaxel, showing a sensitizer and synergistic effect. In ovo, the previous administration of cannabidiol in solution followed by its co-administration with paclitaxel, shows a significantly higher inhibitory effect on ovarian tumor growth than single paclitaxel. The developed nanoparticles are efficiently uptaken by SKOV-3 cells, showing folic acid coated formulations a faster internalization. Although coated formulations do not exhibit a higher in vitro antiproliferative effect compared to cannabidiol in solution or non-coated formulations, in ovo its antitumoral efficacy is significantly higher. This indicates that folic acid-coated nanoparticles represent a good strategy to target cannabidiol to ovarian tumors. Finally, cannabidiol-loaded nanoparticles improve the in vitro antiproliferative effect of paclitaxel, showing folic acid-coated-formulations a better efficacy than cannabidiol in solution.*

#### Palabras Clave:

Ácido fólico  
Cannabinoides  
Cáncer de ovario  
Nanoencapsulación  
Paclitaxel  
Terapia de combinación  
Vectorización activa

#### Keywords:

Folic acid  
Cannabinoids  
Nanoencapsulation  
Ovarian Cancer  
Paclitaxel  
Combination Therapy  
Active targeting



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye un importante problema de salud pública global, con una estimación de más de 23 millones de casos en el año 2030 (1). En la población femenina, el cáncer de ovario constituye una de las neoplasias más importantes debido a su elevada mortalidad, solo el 45 % de las mujeres presentan una tasa de supervivencia superior a 5 años. De hecho, esta patología es conocida como el "asesino silencioso", ya que en la mayor parte de los casos ( $\approx 80\%$ ) es diagnosticado en estadios avanzados de la enfermedad, al presentar una sintomatología inespecífica que se confunde con otras patologías (2, 3), lo que dificulta el tratamiento y aumenta considerablemente la mortalidad.

La resección quirúrgica del tumor constituye la principal estrategia terapéutica, y suele combinarse con otras estrategias disponibles, principalmente con quimioterapia, debido, sobre todo, al riesgo de diseminación de las células tumorales por la cavidad intraperitoneal durante la operación (4, 5). Por lo general, los regímenes quimioterápicos utilizados incluyen una combinación de un "compuesto de platino" (cisplatino o carboplatino) y un taxano (paclitaxel o docetaxel). La doxorrubina, gemcitabina y ciclofosfamida, entre otros, también son utilizados en el tratamiento de cánceres ováricos (6).

Los tratamientos quimioterápicos actuales son, en su mayoría, muy tóxicos y presentan efectos adversos considerables que limitan la dosis utilizada y comprometen, en muchos casos, la adherencia al tratamiento (7, 8). En este contexto, la aparición de nuevos agentes anticancerígenos con una menor toxicidad y que potencien la actividad de los tratamientos actuales resulta altamente beneficioso, ya que nos permitirían reducir la dosis de los quimioterápicos convencionales y, por consiguiente, los efectos adversos sin repercutir en la eficacia terapéutica. Uno de estos nuevos potenciales agentes antitumorales son los cannabinoides.

En las últimas décadas, los cannabinoides han surgido como potenciales activos de interés en una gran variedad de patologías tales como esclerosis múltiple, epilepsia, dolor y cáncer (9, 10). De hecho, diversas formulaciones a base de cannabinoides están comercializadas para el tratamiento de diversos trastornos. Precisamente, una de las patologías donde presentan un importante potencial terapéutico es el cáncer. Por un lado, los cannabinoides son útiles como agentes paliativos, al combatir las náuseas y vómitos relacionados con los tratamientos quimioterápicos y el dolor relacionado con el cáncer; de hecho, diversas formulaciones a base de cannabinoides están comercializadas con este propósito. Por otro, como agentes antitumorales per se, al inhibir la proliferación, migración e invasión de las células tumorales y al presentar un potencial efecto coadyuvante con quimioterápicos convencionales (11, 12).

En terapia antitumoral, el cannabidiol es uno de los cannabinoides más prometedores (13). Es el segundo fitocannabinoide más abundante, por detrás del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, cuya principal ventaja frente a otros es la ausencia de efectos psicótropos (14). De hecho, diversas investigaciones han demostrado que el CBD disminuye los efectos psicótropos del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (15). El CBD ha demostrado un importante potencial anticancerígeno en una gran variedad de tumores tales como cáncer de mama, próstata, glioma, neoplasias hematológicas y tumores gastrointestinales, entre otros (16-18). Sin embargo, el potencial antitumoral de los cannabinoides en general y el CBD en particular, no ha sido evaluado en cáncer de ovario. No obstante, cabe destacar que el sistema cannabinoide endógeno, concretamente los receptores específicos de cannabinoides tipo I se han encontrado sobreexpresados en tumores de ovario, estando relacionada esta sobreexpresión con una mayor agresividad de la enfermedad. Esto sugiere que los cannabinoides pueden presentar un importante potencial terapéutico en este tipo de tumores (19).

Además, el CBD ha demostrado ser útil en terapia de combinación al potenciar, por ejemplo, el efecto antiproliferativo de la vinblastina y vincristina en leucemia (20, 21) y de la temozolomida en glioma (22, 23). De hecho, actualmente se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos para evaluar el potencial del CBD en combinación con radioterapia y/o los tratamientos quimioterápicos convencionales en glioma, mieloma múltiple y tumores gastrointestinales (NCT03607643, NCT03529448, NCT03246113).

Sin embargo, a pesar del potencial terapéutico del CBD su elevada liposolubilidad dificulta el diseño y desarrollo de formulaciones eficaces, siendo necesario el uso de solventes no acuosos y surfactantes para su administración (24). El uso de nanopartículas poliméricas como transportadores de CBD permitiría su administración en vehículos acuosos. Además, desde el punto de vista terapéutico, el uso de estos sistemas resultaría altamente beneficioso en terapia antitumoral. El endotelio vascular alterado y el menor drenaje linfático que caracteriza a los tumores hace que los nanosistemas tiendan a acumularse a nivel tumoral (25).

Por otro lado, la incorporación de ligandos reconocidos por receptores sobreexpresados en las células tumorales posibilitaría una mayor captación por parte de los tumores, incrementando la eficacia terapéutica (26). En cáncer de ovario, un ligando promotor es el ácido fólico, ya que el 90 % de los tumores de ovario sobreexpresan receptores de folato (27, 28). Por todo ello, en este trabajo se han diseñado nanopartículas poliméricas de CBD funcionalizadas con ácido fólico. Se seleccionó el polímero biocompatible y biodegradable PLGA, ya que está aprobado por la FDA para diversas aplicaciones biomédicas.

El objetivo del presente trabajo de investigación ha sido



diseñar, desarrollar y evaluar nanopartículas poliméricas de CBD eficaces para el tratamiento de cáncer de ovario en monoterapia o en combinación con agentes antineoplásicos convencionales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

El CBD es de THC-Pharma (Alemania), y la DOX, CIS y PTX, son de Fisher-Scientific (España). El resómero de PLGA-RG®-502 (PLGA-502) (v.i. 0.16–0.24 dL/,) de Evonik® (Alemania) y el alcohol polivinílico de Sigma-Aldrich (USA). El ácido fólico y todos los reactivos de funcionalización son Fisher-Scientific (España). Todos los solventes orgánicos utilizados (etanol, metanol, acetonitrilo y diclorometano) son grado HPLC (Fisher-Scientific, España). El reactivo MTT es de Sigma-Aldrich (USA). El medio de cultivo RPMI-1640- GlutaMAX™-I, la Tripsina (0.25 %), gentamicina (10 mg/ml), glutamina y la matriz extracelular Geltrex® son de Gibco (Life-Technologies, USA). El suero bovino fetal es de Biowest (Francia) y el kit de apoptosis con Annexin-V FITC ioduro de propidio (V13242) de Invitrogen (Life-Technologies, USA).

### 2.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares SKOV-3 y OAW-42 de cáncer de ovario son de American Type Culture Collection (ATCC) y de European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) respectivamente. Las células se mantuvieron a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>, utilizando RPMI-1640 enriquecido con glutamina (200 mM) y RPMI-1640 Gluta-MAX™ como medio de cultivo para la células OAW-42 y SKOV-3 respectivamente. El medio de cultivo se suplemento con suero bovino fetal (10 % v/v) y gentamicina (1 % v/v). Los experimentos se realizaron entre los pases celulares 5-30.

### 2.3. Actividad antitumoral *in-vitro* del CBD<sub>sol</sub>

#### 2.3.1. Estudios de viabilidad celular

La actividad antiproliferativa del CBD<sub>sol</sub> se evaluó en las células OAW-42 y SKOV-3. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (1.5 10<sup>4</sup> células/ cm<sup>2</sup>) y se trataron (24 horas después) con CBD<sub>sol</sub> (6.25-50 μM) durante 24 y 48 horas. La viabilidad celular se determinó mediante MTT. Como control negativo y positivo de muerte celular se emplearon células tratadas con medio de cultivo y Triton-X (1 % v/v), respectivamente. La solución patrón de CBD se preparó en etanol absoluto (20 mM) y se diluyó con medio de cultivo. Se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> de CBD utilizando el programa CompuSyn-Software (ComboSyn, USA). En células SKOV-3 también se evaluó el efecto de concentraciones bajas de CBD (100-1000 nM) tras 24, 48 y 72 horas de incubación.

#### 2.3.2. Evaluación de apoptosis

Las células SKOV-3 se trataron con CBD en solución (20 y 30 μM) durante 24 y 48 horas. A continuación, las células se levantaron, tiñeron con Annexin V-FITC y ioduro de propidio, y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se analizaron mediante el citómetro FACScan Becton Dickinson, USA).

#### 2.3.3. Ensayos de migración celular

El efecto del CBD<sub>sol</sub> en la migración de células tumorales de ovario se evaluó en las células SKOV-3 (altamente invasiva) mediante:

##### Ensayo de "cierre de la herida"

Las células se sembraron en placas Ibidi de 8 pocillos a una densidad de (55000 células/pocillo). Tras 24 horas, las células, completamente confluentes, se trataron con mitomicina-C (25 μg/ml) durante 30 minutos para inhibir la proliferación celular. En la monocapa celular se generó un hueco con una pipeta de 200 μL y se trataron con CBD (5 y 15 μM) durante 24 horas. A diferentes tiempos (0, 12 y 24 horas) las células se fotografiaron para evaluar la migración celular a través del hueco generado, determinando el área del hueco a cada tiempo mediante el software Image J. La capacidad migratoria de las células (%) se determinó de manera relativa con respecto al control (células tratadas con medio de cultivo) utilizando la siguiente ecuación (29):

$$\text{Capacidad migratoria (\%)} = \frac{\left[ \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \right]_{\text{CBD}} \cdot 100}{\left[ \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \right]_{\text{Control}}}$$

Donde A<sub>0</sub> es el área del hueco generado a t=0 y A<sub>t</sub> el área a t= 6 o 24 horas.

##### Ensayo de migración Transwell

Las células se sembraron en insertos Transwell (8 μm de tamaño de poro) de placas de 24 pocillos (105 células/inserto) (Falcon, USA) y se trataron con CBD<sub>sol</sub> (15 y 30 μM) durante 24 horas. Las células presentes en la parte superior del inserto se eliminaron con una torunda de algodón. Las células que migraron a la parte inferior del inserto se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta (0.1 % v/v). Tras varios lavados, el cristal violeta se extrajo con una solución de ácido acético al 10 % y la absorbancia se midió a 595 nm. Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular (105 células/ pocillo en placas de 24 pocillos) para corregir los resultados del experimento de migración celular.

Finalmente, se calcularon los porcentajes de migración celular, expresados de manera relativa con respecto al control (100 %).



#### 2.3.4. Ensayos de invasión celular

El efecto del CBDsol en la invasión de las células SKOV-3 se determinó mediante el ensayo tipo Transwell. Los insertos Transwell (8  $\mu$ m de tamaño de poro) de placas de 24 pocillos (Falcon, USA) fueron previamente cubiertos con una solución de Geltrex (150  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>). Las células SKOV-3 se añadieron a la cámara superior del inserto en medio de cultivo libre de suero bovino. En la cámara inferior se añadió medio de cultivo con suero al 10 % como quimioatrayente. El CBDsol (15 and 30  $\mu$ M) se añadió en ambas cámaras. Después de 24 horas, los insertos se lavaron cuidadosamente con PBS y las células remanentes en la cámara superior se eliminaron con una torunda de algodón. A continuación, las células presentes en la cámara inferior del inserto (células que han invadido) se fijaron, tiñeron y cuantificaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.3 para el ensayo de migración Transwell.

Los resultados obtenidos se corrigieron con los datos de viabilidad celular. El porcentaje de invasión también se calculó y expresó de manera relativa con respecto al control (100 %).

#### 2.3.5. Estudios de combinación con otros antineoplásicos:

##### - Estudios de sensibilización (preadministración):

El objetivo es evaluar si la administración previa de concentraciones subterapéuticas de CBD (muerte celular <10 %) incrementa la sensibilidad de las células tumorales de ovario al PTX, DOX y CIS. Las células SKOV-3 se sembraron en placas de 96 pocillos (1.5  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>) y se trataron, 24 horas después, con CBDsol (1 y 10  $\mu$ M). A continuación, las células se trataron exclusivamente con PTX (10-500 nM), DOX (0.5-60  $\mu$ M) y CIS (1-100  $\mu$ M). Tras 48 horas de incubación se determinó la viabilidad celular mediante MTT y se calcularon los valores de CI<sub>50</sub>. Se consideró que se producía un efecto sensibilizador si había una disminución estadísticamente significativa en los valores de CI<sub>50</sub> en las células pretratadas con CBD.

##### - Estudios de sinergismo (coadministración):

Las células SKOV-3 se sembraron en placas de 96 pocillos (1.5  $10^4$  células / cm<sup>2</sup>) y se trataron, 24 horas después, con las diferentes combinaciones de CBD en solución (10, 15 y 20  $\mu$ M) y PTX (10-500 nM), DOX (0.5-60  $\mu$ M) o CIS (1-100  $\mu$ M). Tras 48 horas, la viabilidad celular se determinó mediante MTT. Se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> y los IC utilizando el Software CompuSyn (30). IC > 1 indican antagonismo, IC = 1 efecto aditivo y IC < 1 sinergismo (31).

También se determinó el efecto de la combinación de CBD y PTX en la inducción de apoptosis. Las células SKOV-3 se trataron con PTX (100 nM) o PTX (100 nM) + CBD 20  $\mu$ M durante 48 horas. La apoptosis se determinó por citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2.

##### - Pre + coadministración:

Las células SKOV-3 se sembraron en placas de 96 pocillos (1.5  $10^4$  células / cm<sup>2</sup>) y se trataron, 24 horas después, con CBDsol (10  $\mu$ M) durante 24 horas. A continuación, el medio se descartó, y las células se trataron con las combinaciones de CBD (10  $\mu$ M) + PTX (10-500 nM) durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó por MTT y se calcularon los valores de CI<sub>50</sub>.

#### 2.4. Actividad antitumoral in vivo del CBD en solución

##### 2.4.1. Actividad del CBDsol en monoterapia

La actividad anticancerígena del CBDsol también se terminó in vivo, usando el modelo "in ovo", en el que los tumores se generan sobre la MCA de embriones de pollo (32). Los huevos de gallina fecundados (DDE=0) se incubaron a 37 °C y 47 % de humedad relativa, bajo rotación automática (180 °C / 4 horas). El DDE=4, se realiza un pequeño orificio (3 mm) en la cáscara del huevo, se tapa con cinta adhesiva y se introducen de nuevo en el incubador sin rotación. El DDE=8, el orificio se agranda y la MCA se "araña" suavemente sin comprometer la viabilidad del embrión. A continuación se inoculan las células SKOV-3 (2  $\cdot$  10<sup>6</sup> cells/huevo) suspendidas en una solución de Geltrex®. El DDE=11, los tumores ya formados, se rodean con un anillo de silicona y se tratan con: CBDsol diariamente (100  $\mu$ M) y medio de cultivo RPMI 1640 que sirve como control. Al menos se trataron 7 huevos por condición. Los huevos se mantuvieron en el incubador hasta el DDE=13.5. El crecimiento del tumor se monitorizó por microscopía (Lumenera INFINITY2-1 CDD), calculando el área de los tumores antes y después del tratamiento, utilizando la siguiente ecuación:

Crecimiento tumoral (%) =  $\frac{[\text{Área del tumor antes del tratamiento}]}{[\text{Área del tumor tras el tratamiento}]}$  DDE:11\*100/ DDE:13.5

##### 2.4.2. Actividad del CBD<sub>sol</sub> en combinación con PTX

La combinación del CBD y PTX también se ha evaluado en este modelo, utilizando el protocolo de pre + coadministración. El DDE=11, los tumores se trataron con CBD en solución (100  $\mu$ M) o medio RPMI-1640 durante 24 horas. A continuación, en el DDE=12 se administró el PTX (100  $\mu$ M). El CBD en solución se añade diariamente hasta el DDE=13.5. Al menos se trataron 7 huevos por condición. El crecimiento del tumor se monitorizó tal y como describimos en el apartado anterior (2.4.1).

#### 2.5. Desarrollo de las nanopartículas de CBD

##### 2.5.1. Elaboración de las nanopartículas de CBD

Se empleó el método de evaporación-extracción del solvente. La fase orgánica (PLGA + CBD disueltos en 1 ml de dicloro-



metano), se goteó sobre una solución acuosa de PVA y se sonicó (Fisher Scientific-Sonicator, USA). La suspensión resultante se mantuvo en agitación (500 rpm) durante 3 horas a temperatura ambiente para evaporar el diclorometano. Las nanopartículas se recolectaron por centrifugación (15000 rpm durante 35 minutos) (Beckman-Coulter-Avanti, USA), se lavaron tres veces con agua desmineralizada para eliminar el exceso de PVA y se liofilizaron durante 24 horas a  $-50^{\circ}\text{C}$  y 0.2 mbar. Como crioprotector se añadió 1 ml de una solución de sacarosa al 3 % (p/v). Para la optimización del protocolo de elaboración de la formulación se emplearon diferentes porcentajes de CBD (1,5-3 %); diferentes porcentajes de PVA (1 y 3 %) y diferentes tiempos de sonicación (2-5).

### 2.5.2. Funcionalización de las nanopartículas de CBD

El ácido fólico se incorporó a la superficie de las nanopartículas no liofilizadas y recién preparadas. En primer lugar, se activaron los grupos COOH libres de la superficie de las nanopartículas mediante la adición de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiiimida y N-hidroxisuccinimida (pH de 4.7). La suspensión se mantuvo en agitación durante 2 horas. Las nanopartículas se recolectaron por centrifugación, se re-suspendieron en PBS (pH 7.4, 9 ml) que contenía 6 mg de ácido fólico y se mantuvieron en agitación 4 horas. Finalmente, las formulaciones funcionalizadas se recolectaron y liofilizaron.

### 2.5.3. Caracterización de las nanopartículas de CBD no funcionalizadas y funcionalizadas con ácido fólico

Las nanopartículas se caracterizaron determinando:

- **Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta:**

Se determinaron por dispersión dinámica de luz láser Microtrac®-Zetatrak™ Particle-Analyzer (Microtrac, USA).

- **Morfología**

Las nanopartículas se suspendieron en agua purificada y añadieron sobre una oblea de silicio adherida a un soporte metálico. Se secaron a vacío, se metalizaron con una capa de 20 nm de oro y se observaron al microscopio electrónico de barrido (Jeol-JSM-6335F, Japón).

- **Determinación del contenido en CBD y eficacia de encapsulación.**

Las nanopartículas liofilizadas se disolvieron en diclorometano (5 mg/ml). El CBD se extrajo con la adición de fase móvil de HPLC en agitación. Las muestras se filtraron y analizaron por HPLC (33). La eficacia de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Ratio CBD:PLGA experimental}}{\text{Ratio CBD:PLGA teórico}} * 100$$

- **ATR**

La presencia de ácido fólico en la superficie de las nanopartículas se confirmó mediante espectroscopia infrarroja utilizando la técnica de ATR (Attenuated Total Reflection) mediante el espectrofotómetro Nicolet-Magna-750 equipado con Spectra-Tech H-ATR (LabX, USA) en un rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

- **Estudios de liberación in vitro del CBD**

Las nanopartículas de CBD liofilizadas se suspendieron (5 mg/ml) en PBS (pH=7.4 + Tween-80 0.5 % (p/v)) y se introdujeron en un baño termostático a  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  con una agitación constante de 100 rpm. A distintos tiempos, se extrajeron alícuotas, se centrifugaron, filtraron y analizaron por HPLC.

### 2.5.4. Estudios en cultivos celulares

- **Eficacia antitumoral in vitro**

La citotoxicidad de las formulaciones de CBD en un rango de concentraciones de CBD de 5-50  $\mu\text{M}$ , se evaluó en las células SKOV-3 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1.

- **Estudios de internalización:**

La captación de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas con ácido fólico se evaluó por microscopía de fluorescencia empleando las nanopartículas cargadas con DiO. Las células SKOV-3 se sembraron, a una densidad de 30000 células/pocillo en placas Ibidi de 8 pocillos. 12 horas más tarde se trataron con una concentración de nanopartículas de 1 mg/ml y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y un 5 %  $\text{CO}_2$  durante 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas. A cada tiempo, las células se lavaron con PBS, fijaron con paraformaldehído 4 % (p/v), tiñeron con DAPI y red-Phalloidin y se observaron por microscopía de fluorescencia (EVOS™, Fisher-Scientific, USA).

### 2.5.5. Actividad antitumoral in vivo de las nanopartículas de CBD

La actividad antitumoral en monoterapia de las nanopartículas de CBD también se evaluó en tumores derivados de las células SKOV-3 generados sobre la MCA de embriones de pollo, tal y como describimos en el apartado 2.4.1. En el DDE=11 los tumores se trataron diariamente (hasta el DDE=13.5) con las diferentes formulaciones de CBD: i) CBD<sub>sol</sub>, ii) CBD-Nps y iii) FA-CBD-Nps a una concentración de CBD de 100  $\mu\text{M}$ . Las formulaciones de nanopartículas blancas (PLGA-Nps y FA-PLGA-Nps) también se evaluaron.

### 2.5.6. Estudios de combinación con PTX

Se determinó el efecto antitumoral in vitro de las nanopartículas de CBD, no funcionalizadas y funcionalizadas con ácido fólico en combinación con el paclitaxel (10-500 nM) en las células SKOV-3 siguiendo el protocolo de pre + coadministración recogido en el apartado 2.3.5.

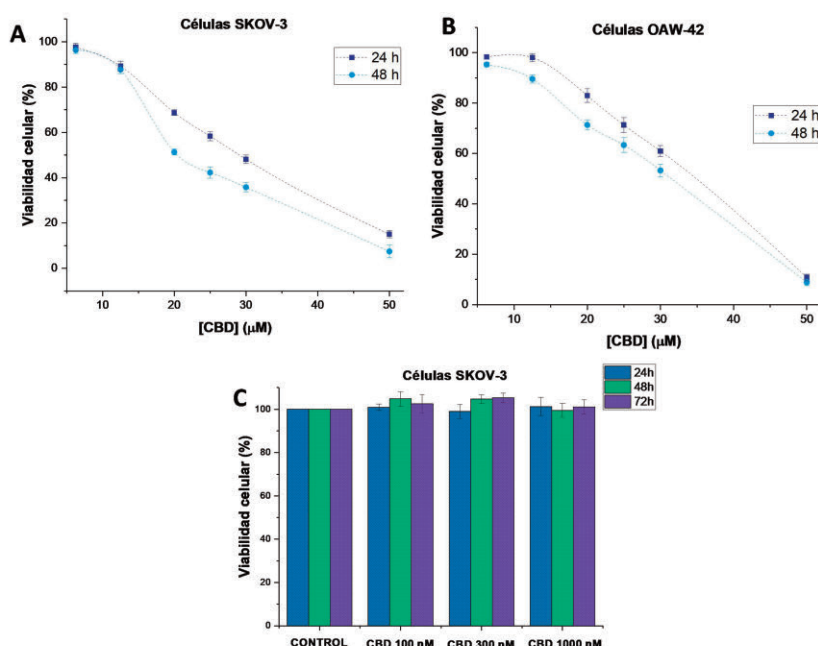


Figura 1: Estudios de viabilidad celular de células SKOV-3 (A) y OAW-42 (B) tratadas con CBD (6.25-50  $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Viabilidad celular de células SKOV-3 tratadas con CBD a concentraciones nanomolares (100-1000 nM) durante 24-72 horas

## 2.6. Análisis estadístico de los resultados

Los datos están expresados como una media  $\pm$  DE de al menos tres experimentos diferentes. El test ANOVA simple seguido de Test de Turkey se utilizó para la comparación de múltiples grupos. La comparación de dos grupos se realizó utilizando la prueba T-Student. Las diferencias estadísticamente significativas se expresaron como: \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Actividad antitumoral in vitro del CBDsol en monoterapia

El CBD inhibe la proliferación de ambas líneas celulares de cáncer de ovario, OAW-42 y SKOV-3 (Figura 1), siendo estas últimas las más sensibles al presentar los valores de  $CI_{50}$  más bajos (Tabla 1). Las diferencias encontradas pueden atribuirse a su distinto perfil histológico. Aunque ambas son células tumorales de ovario epiteliales (los tumores más frecuentes), las células OAW-42 son exclusivamente de tipo seroso y las SKOV-3 son una mezcla de tipo seroso y de células claras. Este hecho podría explicar que presenten una mayor sensibilidad al CBD. De hecho, también se han encontrado diferencias con tra-

tamientos quimioterápicos convencionales, como es el caso de los taxanos, siendo las células SKOV-3 mucho más sensibles al PTX y docetaxel (34). Teniendo en cuenta la mayor sensibilidad de las células SKOV-3 al CBD, así como su elevado grado de invasividad; se seleccionaron para el resto de los estudios llevados a cabo en el presente trabajo de investigación.

Hay autores que han demostrado que algunos cannabinoides presentan un efecto bifásico, y a concentraciones bajas (en el intervalo nanomolar) estimulan la proliferación de las células tumorales (35, 36). En el caso del CBD, no se apreció este efecto bifásico, concentraciones de 100-1000 nM no modificaron la viabilidad de las células SKOV-3 durante 24-72 horas de incubación (Figura 1C).

La apoptosis es uno de los mecanismos responsables de

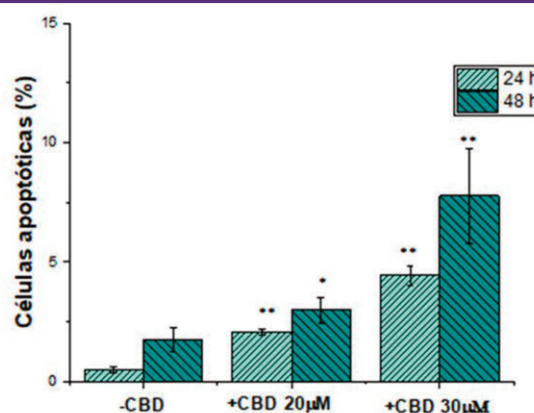


Figura 2: Porcentaje de células SKOV-3 en apoptosis obtenidos por citometría de flujo tras el tratamiento con medio de cultivo (-CBD), CBD 20 y 30  $\mu$ M durante 24 y 48 horas. \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ) indican diferencias estadísticamente significativas con el control.

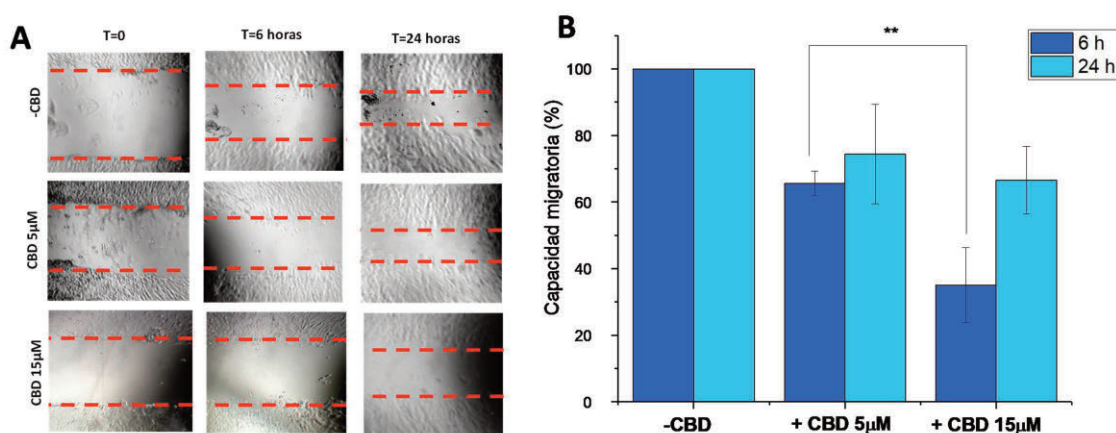


Figura 3: Ensayo de migración celular de "cierre de herida" de las células SKOV-3 tratadas con medio de cultivo (-CBD) y CBD 5 y 15 μM durante 6 y 24 horas (A). Capacidad migratoria relativa (%) de cada una de las células (B).

la muerte celular del CBD (37, 38). En el presente trabajo, la inducción de apoptosis se evaluó por citometría de flujo. Tal y como se puede observar en la Figura 2, el tratamiento de las células SKOV-3 con CBD<sub>sol</sub> incrementó ligeramente el porcentaje de células apoptóticas. Los valores obtenidos (< 10 % en todos los casos) son muy inferiores a los publicados en otros tumores. Por ejemplo, en células de cáncer de cérvix, concentraciones de CBD equivalentes a la CI<sub>50</sub> presentaron porcentajes de apoptosis en el intervalo de 28.6-51 % (dependiendo de la línea celular). Esto indica que la inducción de apoptosis no es el mecanismo principal de muerte en las células SKOV-3.

Además del efecto antiproliferativo, algunos autores han demostrado que el CBD inhibe la migración e invasión de células tumorales de mama, glioma y cérvix (39-41). Estas propiedades serían especialmente interesantes en el caso de tumores de ovario, debido a la tendencia a metastatizar. Por ello, en el presente trabajo se ha comprobado el efecto del CBD en la migración e invasión de las células SKOV-3.

Tal y como se puede observar en el ensayo de "cierre de la herida" (Figura 3), el tratamiento con CBD (a concentraciones inferiores a los valores de CI<sub>50</sub>) inhibe la migración de las células SKOV-3. Sin embargo, diferencias estadísticamente significativas

entre ambas concentraciones ( $p < 0.05$ ) solo se observaron a tiempos de incubación cortos. A las 24 horas, se observó una disminución de la capacidad migratoria de las células SKOV-3 en torno al 30 %.

En el ensayo de migración Transwell (Figura 4A), también se observó un efecto inhibitorio de la migración celular, del ≈12 y 30 % a concentraciones de CBD de 15 y 30 μM respectivamente, y aunque deberían realizarse más estudios en este sentido, se puede concluir que el CBD presenta un efecto inhibitorio de la migración de las células SKOV-3. Sin embargo, en el ensayo de invasión tipo Transwell (Figura 4B), solo se observó una ligera inhibición de la invasión de las células SKOV-3 (≈14 %) a concentraciones de CBD de 30 μM.

### 3.2. Estudios de combinación del CBD<sub>sol</sub>

Una vez demostrado el efecto inhibitorio del CBD sobre las células tumorales de ovario, se ha evaluado su combinación con agentes antineoplásicos convencionales utilizados en el tratamiento de tumores ováricos: cisplatino, paclitaxel y doxorrubicina.

La combinación de CBD (1-20 μM) y PTX (10-500 nM) fue altamente eficaz. Por un lado, la administración previa de CBD<sub>sol</sub> sensibilizó a las células SKOV-3 frente al PTX (Figura 5A), observándose una disminución de los valores de CI<sub>50</sub> del PTX. Sin em-

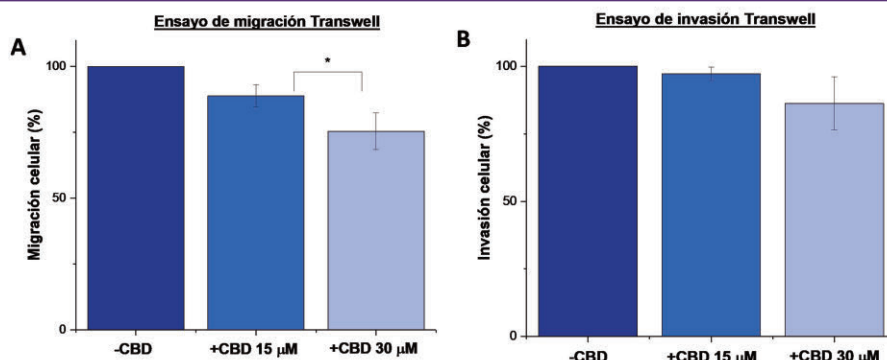


Figura 4: Resultados de migración (A) e invasión (B) de las células SKOV-3 tratadas con medio de cultivo (-CBD) y con CBD 15 y 30 μM durante 24 horas en los ensayos tipo Transwell. \* diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

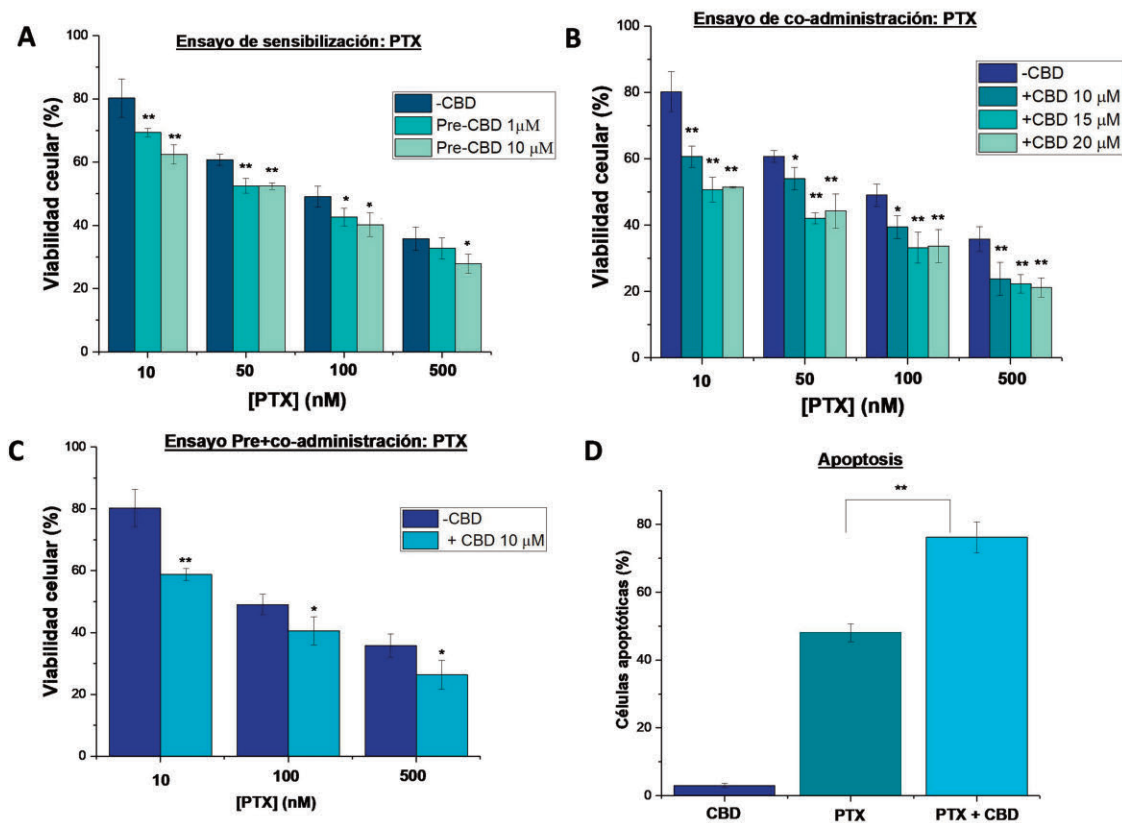


Figura 5: Viabilidad de las células SKOV-3 en los diferentes ensayos de combinación del CBD y PTX: A) ensayo de sensibilización con la administración previa de CBD (1 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas, seguida del tratamiento con PTX (10-500 nM) durante 48 horas; B) ensayo de co-administración con el tratamiento de las células durante 48 horas con las diferentes combinaciones de CBD (10-20  $\mu$ M) y PTX (10-500 nM) y C) ensayo de pre + co-administración con el pre-tratamiento de las células con CBD 10  $\mu$ M durante 24 horas seguido de la co-administración d CBD 10  $\mu$ M + PTX (10-500 nM). Resultados de apoptosis (citometría de flujo) tras el tratamiento con CBD 20  $\mu$ M, PTX 100 nM o su combinación durante 48 horas (D). \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ) indican diferencias estadísticamente significativas con el PTX como tratamiento único.

bargo, diferencias estadísticamente significativas entre las células pretratadas y no tratadas con CBD solo se observaron con la administración de CBD 10  $\mu$ M (Tabla2). En la coadministración de ambos compuestos, CBD + PTX, se observó un efecto sinérgico moderado (Figura 5B), ya que se obtuvieron valores de IC comprendidos en el

intervalo de 0.71-1.01 en todas las combinaciones (Tabla S1 de material complementario). La coadministración de ambos agentes sería altamente beneficiosa. En primer lugar, hay que tener en cuenta que el CBD presenta, en general, una baja toxicidad, especialmente en comparación con los tratamientos quimioterápicos. En segundo lugar, el efecto sinérgico de ambos compuestos permitiría reducir la dosis de PTX y, por consiguiente, sus efectos adversos. Por ejemplo, la combinación de CBD 10  $\mu$ M y PTX 100 nM produce una muerte celular ( $\approx 60$  %) similar que la administración de PTX 500 nM. Además, diversos autores han demostrado que el CBD inhibe el dolor neuropático asociado al PTX (42-44), haciendo esta combinación aún más interesante.

Los resultados de citometría de flujo demostraron que este efecto sinérgico del CBD y PTX puede atribuirse a un incremento en la inducción de apoptosis (Figura 5D). Mientras que en las células tratadas con PTX (100 nM) durante 48 horas el porcentaje de células apoptóticas fue en torno al 50 %, en las células tratadas con PTX (100 nM) + CBD (20  $\mu$ M) fue significativamente ( $p < 0.01$ ) superior ( $\approx 80$  %). Cabe decir que otros autores encontraron resultados similares en células de cáncer de estómago tratadas con PTX y anandamida (un endocannabinoide), demostrando que este

	PTX CI50 (nM)
PTX	105.52 $\pm$ 22.32
Pre-CBD 1 $\mu$ M	72.94 $\pm$ 8.03
Pre-CBD 10 $\mu$ M	63.19 $\pm$ 7.71*
Co-CBD 10 $\mu$ M	39.53 $\pm$ 1.68**
Co-CBD 15 $\mu$ M	13.14 $\pm$ 1.50**
Co-CBD 20 $\mu$ M	14.05 $\pm$ 3.88**
Pre+ Co-CBD 10 $\mu$ M	29.48 $\pm$ 6.82**

Tabla 2: CI50 del paclitaxel en las células SKOV-3. \* y \*\* indican diferencias estadísticas mente significativas ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) entre los valores de CI50 de las células tratadas con PTX y con las diferentes combinaciones de CBD y PTX

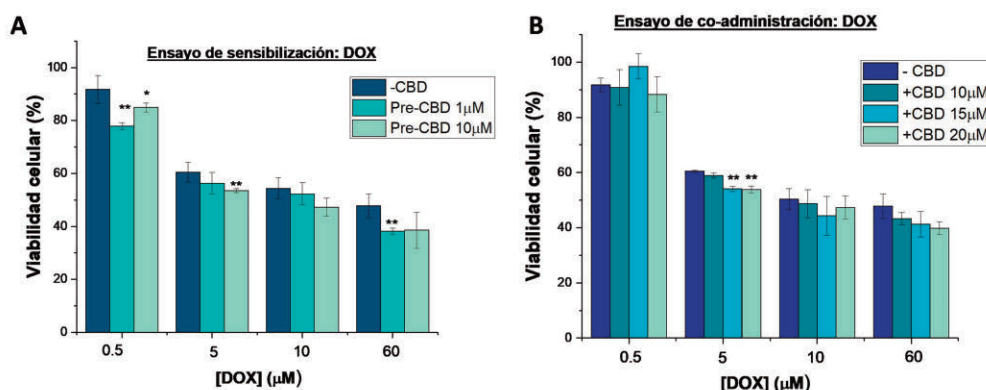


Figura 6: Viabilidad de las células SKOV-3 en los diferentes ensayos de combinación del CBD y DOX: A) ensayo de sensibilización con la administración previa de CBD (1 y 10 $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas, seguida del tratamiento con DOX (0.5-60  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas y B) ensayo de co-administración con el tratamiento de las células durante 48 horas con las diferentes combinaciones de CBD (10-20 $\mu\text{M}$ ) y DOX (0.5-60  $\mu\text{M}$ ). \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ) indican diferencias estadísticamente significativas con el DOX como tratamiento único.

endocannabinoide incrementa de manera considerable la apoptosis inducida por el PTX (45).

Debido a los prometedores resultados obtenidos en los estudios de sensibilización y coadministración con el PTX, se evaluó la combinación de ambos protocolos (pre+co-administración). Tal y como se puede observar en la Figura 5C, esta estrategia de tratamiento resultó altamente efectiva, produciéndose una disminución en los valores de  $\text{CI}_{50}$  del PTX en torno al 70 %. De hecho, siguiendo este protocolo la combinación de PTX 10 nM y CBD 10 $\mu\text{M}$  produce un efecto similar que la administración de PTX 100 nM.

La combinación del CBD con DOX también sería altamente prometedora, ya que el CBD ha demostrado tener un efecto cardioprotector sobre la toxicidad cardiaca inducida por la DOX, su principal efecto adverso (46, 47). Sin embargo, la combinación con el CBD no fue eficaz (Figura 6A). Por un lado, en los estudios de sensibilización, aunque se observó una disminución de los valores de  $\text{CI}_{50}$  en las células pretratadas con CBD, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). Por otro lado, la coadministración de CBD (10-20 $\mu\text{M}$ ) y DOX (0.5-60 $\mu\text{M}$ ) no resultó eficaz (Figura 6B). De hecho se obtuvieron  $\text{IC} > 1$  (Tabla S2 material com-

plementario) en todas las combinaciones evaluadas, a excepción de la combinación de DOX 5 $\mu\text{M}$  con CBD 10 y 15 $\mu\text{M}$ , donde se obtuvieron  $\text{IC}$  de 0.8 y 0.92 respectivamente, lo que nos indica un antagonismo moderado entre ambos fármacos.

Finalmente, la combinación con CIS también resultó ineficaz (Figura 7 A y B). En las células pretratadas con CBD, se observaron incluso valores de  $\text{CI}_{50}$  de CIS ligeramente superiores a las células no tratadas, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4). En los estudios de combinación se obtuvieron  $\text{IC} > 1$

	CIS $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
CIS	38.71 $\pm$ 6.85
Pre-CBD 1 $\mu\text{M}$	39.76 $\pm$ 6.05
Pre-CBD 10 $\mu\text{M}$	40.50 $\pm$ 5.71
Co-CBD 10 $\mu\text{M}$	36.13 $\pm$ 2.97
Co-CBD 15 $\mu\text{M}$	28.47 $\pm$ 3.53
Co-CBD 20 $\mu\text{M}$	26.97 $\pm$ 5.30

Tabla 4:  $\text{CI}_{50}$  del cisplatino en las células SKOV-3 con las diferentes combinaciones evaluadas

	DOX $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
DOX	18.65 $\pm$ 4.25
Pre-CBD 1 $\mu\text{M}$	17.82 $\pm$ 2.58
Pre-CBD 10 $\mu\text{M}$	12.26 $\pm$ 3.16
Co-CBD 10 $\mu\text{M}$	15.16 $\pm$ 2.78
Co-CBD 15 $\mu\text{M}$	12.58 $\pm$ 5.96
Co-CBD 20 $\mu\text{M}$	11.29 $\pm$ 5.30

Tabla 3:  $\text{CI}_{50}$  de la doxorubicina en las células SKOV-3 con las diferentes combinaciones evaluadas

(Tabla S3 material complementario), incluso superiores a 2 en algunas combinaciones, indicando que se produce un antagonismo ligeramente superior que con la DOX.

### 3.3. Eficacia antitumoral *in ovo* del CBD<sub>sol</sub>

En las últimas décadas este modelo ha sido propuesto como una gran herramienta terapéutica en investigación sobre el cáncer, convirtiéndose en un paso intermedio entre los cultivos celulares y los animales de experimentación (48). Precisamente, uno

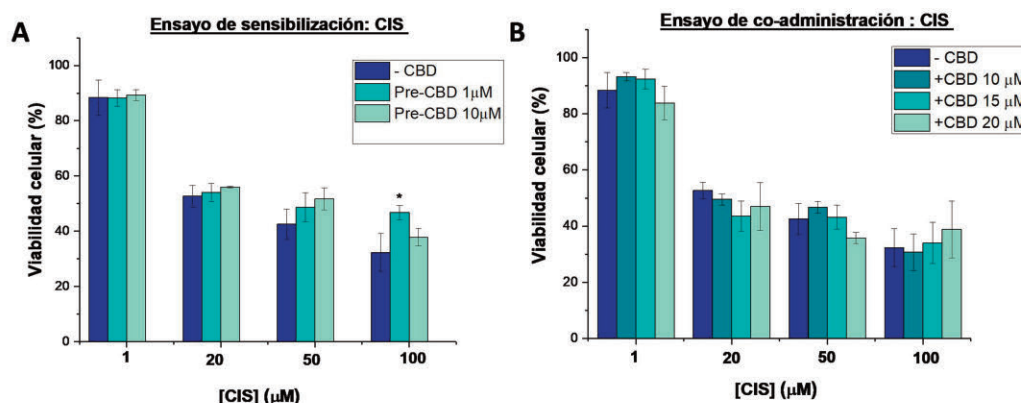


Figura 7: Viabilidad de las células SKOV-3 en los diferentes ensayos de combinación del CBD y DOX: A) ensayo de sensibilización con la administración previa de CBD (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas, seguida del tratamiento con CIS (1-100  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas y B) ensayo de co-administración con el tratamiento de las células durante 48 horas con las diferentes combinaciones de CBD (10-20  $\mu\text{M}$ ) y CIS (1-100  $\mu\text{M}$ ). \* ( $p < 0.05$ ) indica diferencias estadísticamente significativas con el CIS como tratamiento único

de los tumores donde más se ha utilizado es el de ovario (49), indicando incluso algunos autores la similitud entre los tumores formados en este modelo con los extraídos de pacientes (50), y convirtiéndolo en una excelente herramienta de investigación.

En la Figura 8A, se observa un ejemplo de los tumores de cáncer de ovario generados sobre la MCA de embriones de pollo. El análisis histopatológico del mismo (tinción hematoxilina-eosina) (Figura 8B) indica que las células tumorales invadieron la MCA del embrión, así como la formación de una neovascularización tumoral.

Tal y como se puede observar en la Figura 8C, la administración diaria de CBD durante 60 horas (a una concentración de

100  $\mu\text{M}$ ), significativamente ( $p < 0.05$ ), disminuyó el crecimiento de tumores de ovario con respecto al control (tumores tratados con medio de cultivo celular), observándose además un efecto inhibitorio similar ( $\approx 40\%$ ) al PTX (100  $\mu\text{M}$  una sola administración). Por último, en este modelo, la combinación de CBD y PTX, siguiendo el protocolo de pre + coadministración confirmó los resultados obtenidos en cultivos celulares, corroborando el potencial interés de incluir el CBD en los regímenes de quimioterapia basados en PTX. Mientras que en los tumores tratados únicamente con PTX se observó una disminución del crecimiento tumoral  $\approx 40\%$ , en los tratados con CBD + PTX, se apreció una reducción significativamente superior ( $p < 0.05$ ) del  $\approx 60\%$  (Figura 8C).

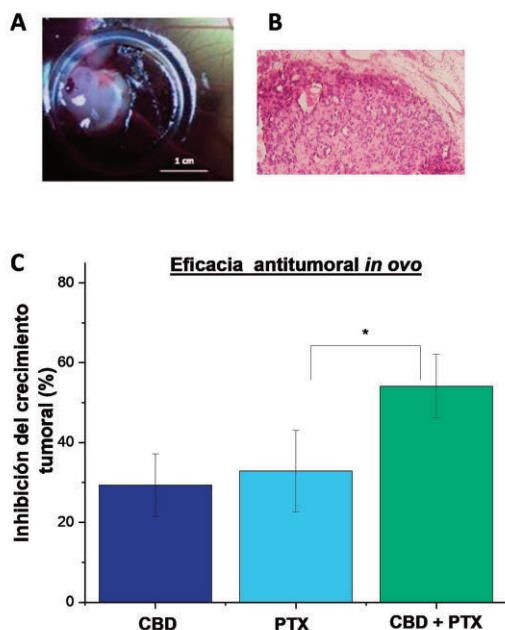


Figura 8: Inhibición del crecimiento tumoral de los diferentes tratamientos administrados: CBD (100  $\mu\text{M}$  administrado diariamente), PTX (100  $\mu\text{M}$  una sola administración durante) y la combinación de ambos. \* ( $p < 0.05$ ) indica diferencias estadísticamente significativas entre la combinación de CBD + PTX y el PTX como tratamiento único.

### 3.4. Desarrollo y caracterización de las nanopartículas cargadas con CBD

#### 3.4.1. Caracterización física de las formulaciones

Las características de las formulaciones desarrolladas durante la optimización del protocolo de nanoencapsulación están recogidas en la Tabla S4 de material complementario. Con el objetivo de conseguir el menor tamaño posible, el mayor contenido en CBD y la menor velocidad de liberación se seleccionaron como adecuados para elaborar las nanopartículas poliméricas de CBD un tiempo de sonicación de 2 minutos, una concentración de PVA del 1 % y un ratio de CBD:PLGA de 1.5: 100 mg.

La incorporación de ácido fólico a la superficie de las nanopartículas produjo un ligero aumento del tamaño de partícula con respecto a las formulaciones no funcionalizadas (Tabla 5). No obstante, solo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en las nanopartículas no cargadas con CBD. Se observó también un aumento en la polidispersión de las formulaciones, con valores de PDI  $> 0.2$  en todas las formulaciones funcionalizadas con ácido fólico.

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (agua)	Rendimiento del proceso (%)	Carga ( $\mu$ g CBD/10 mg Nps)	EE (%)
PLGA- Nps	228.47 $\pm$ 8.36	0.141 $\pm$ 0.019	-24.7 $\pm$ 1.48	61.8 $\pm$ 4.27	-----	-----
CBD-Nps	236.08 $\pm$ 12.02	0.165 $\pm$ 0.009	-16.6 $\pm$ 1.22	51.2 $\pm$ 6.22	140.2 $\pm$ 6.25	95.23 $\pm$ 3.3
FA-PLGA-Nps	259.1 $\pm$ 8.47	0.271 $\pm$ 0.031	-29.5 $\pm$ 0.20	48.62 $\pm$ 12.22	-----	-----
FA-CBD-Nps	241.5 $\pm$ 10.21	0.210 $\pm$ 0.033	-18.4 $\pm$ 0.66	50.94 $\pm$ 5.27	120.5 $\pm$ 15.57	81.97 $\pm$ 14.97
DiO-Nps	230.27 $\pm$ 7.58	0.175 $\pm$ 0.021	-28.2 $\pm$ 1.52	62.5 $\pm$ 2.33	-----	-----
FA-DiO-Nps	248.3 $\pm$ 9.72	0.227 $\pm$ 0.085	-31.27 $\pm$ 1.70	50.94 $\pm$ 10.22	-----	-----

Tabla 5: Características de las formulaciones optimizadas funcionalizadas y no funcionalizadas con ácido fólico elaboradas

En cuanto a la carga superficial, cabe destacar que todas las formulaciones presentaron un potencial zeta negativo debido a los grupos carboxilo libres del PLGA. La incorporación de AF a la superficie de las nanopartículas produjo, como era de esperar, una reducción en el valor del potencial zeta aunque, en todos los casos, esta disminución fue muy pequeña. La unión de los grupos carboxilo activados del PLGA con el grupo amino libre del ácido fólico debería producir un aumento de la carga superficial de las nanopartículas; sin embargo, el ácido fólico presenta dos grupos carboxilos libres, siendo, probablemente, los responsables de esta ligera disminución en el potencial zeta de las nanopartículas funcionalizadas. Por otro lado, desde el punto de vista morfológico, no se apreció ningún cambio (Figura 9). Todas las nanopartículas presentaron una forma esférica y una superficie lisa y sin poros.

### 3.4.2. Carga, eficacia de encapsulación y estudios de liberación

Los valores de carga y eficacia de encapsulación de las formulaciones de CBD están recogidos en la Tabla 5. La incorporación de AF a la superficie de las nanopartículas produjo una disminución no significativa ( $p > 0.05$ ) del contenido en CBD, probablemente, debido a una pérdida durante el proceso de funcionalización. También se observó una liberación más rápida, debido al mayor efecto burst durante los primeros 60 minutos del ensayo ( $\approx 37$  y 50 % del CBD liberado en las CBD-Nps y FA-CBD-Nps respectivamente) (Figura 10). No obstante, en ambas formulaciones, se apreció una liberación controlada del CBD durante al menos 72 horas, con aproximadamente el 90 % del CBD liberado.

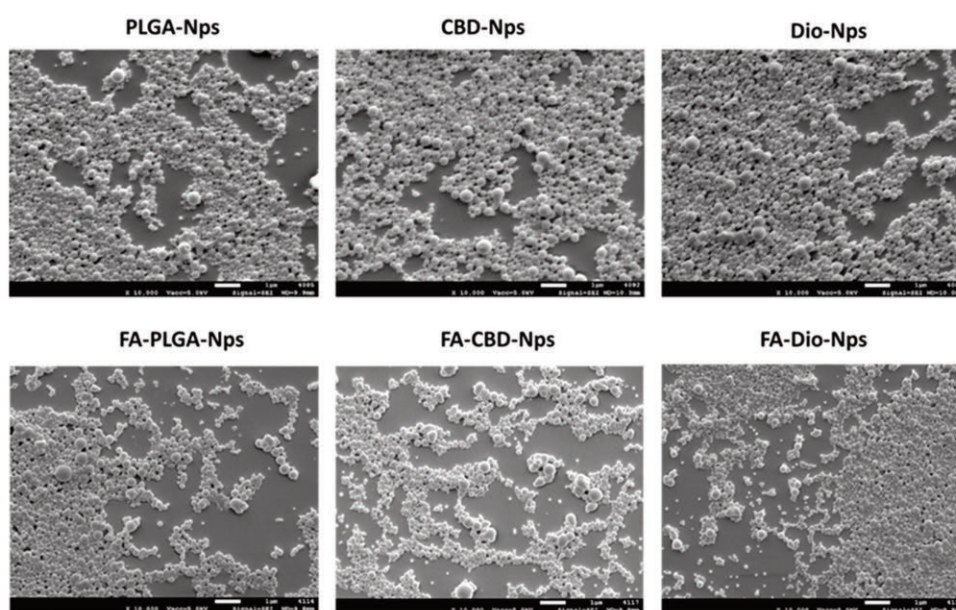


Figura 9: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de todas la nanopartículas desarrolladas

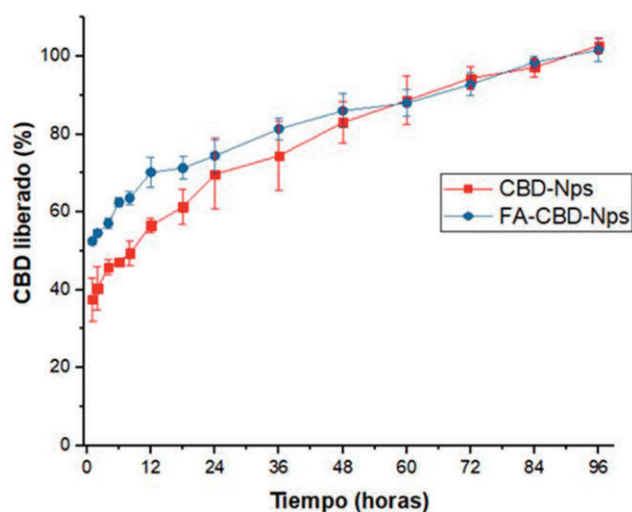


Figura 10: Perfil de liberación in vitro de las nanopartículas de CBD funcionalizadas y no funcionalizadas con ácido fólico

### 3.4.3. ATR

Estos estudios confirmaron la unión de ácido fólico a la superficie de las nanopartículas de CBD. En el espectro de ATR de las nanopartículas de CBD no funcionalizadas (Figura 11), se pueden apreciar los picos característicos del PLGA: 3340  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), a 2940  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1750  $\text{cm}^{-1}$  (C=O de los grupos ester), 1380  $\text{cm}^{-1}$  (-CH<sub>3</sub> del ácido láctico) y 1090  $\text{cm}^{-1}$  (C-O), (51, 52). En las formulaciones funcionalizadas con ácido fólico, se ha producido un engrosamiento de la banda de 3340  $\text{cm}^{-1}$ , probablemente debido a la contribución de las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H la molécula de ácido fólico, así como también aparecen diversos picos en el intervalo de 1700-1500

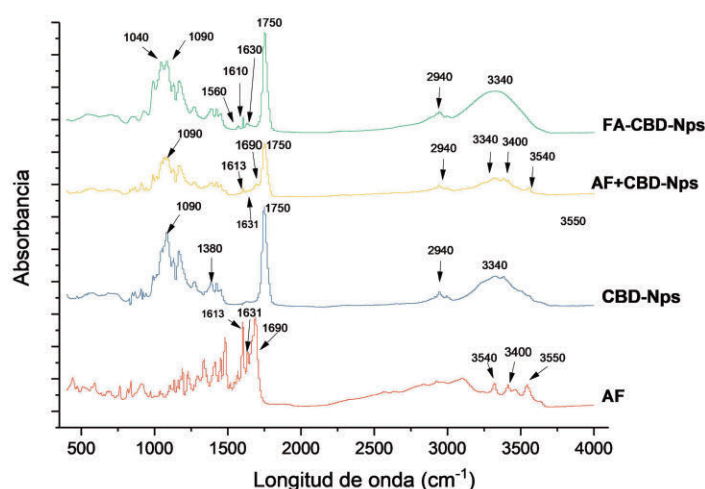


Figura 11: Espectros de ATR del ácido fólico (AF), las nanopartículas no funcionalizadas (CBD-Nps), la mezcla física de ambos (AF+CBD-Nps) y las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico (FA-CBD-Nps).

$\text{cm}^{-1}$ , que pueden atribuirse al anillo de pterina y fenilo del ácido fólico. Además, en las FA-CBD-Nps ha desaparecido el pico de 3540  $\text{cm}^{-1}$ , que junto con el pico de 3400  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a las vibraciones del enlace N-H de la amina primaria; amina que ha desaparecido debido a la unión con el PLGA. Estos dos picos están presentes en el espectro del ácido fólico y de la mezcla física del mismo con las CBD-Nps, donde el pico de 3400  $\text{cm}^{-1}$  parece estar enmascarado en la banda del PLGA en torno a 3340  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces O-H) (53, 54). Los resultados obtenidos nos indican la unión de la molécula de ácido fólico sobre la superficie de las nanopartículas.

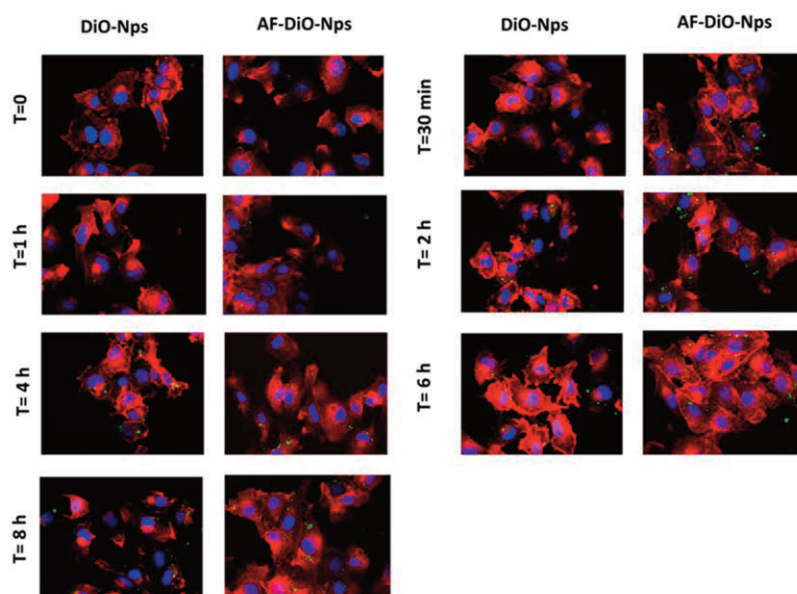


Figura 12: Estudios de internalización de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas con ácido fólico en células SKOV-3. Tinción con DAPI (núcleo celular): azul; tinción con Red-Phalloidin (citoesqueleto): rojo; tinción con DiO: (nanopartículas): verde

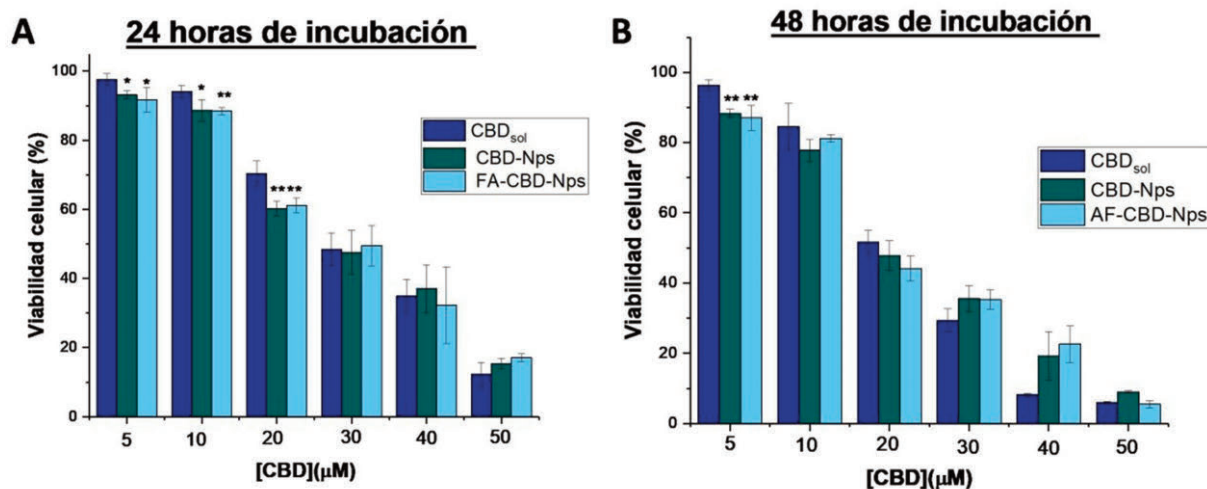


Figura 13: Estudios de viabilidad en células SKOV-3 de las nanopartículas de CBD funcionalizadas y no funcionalizadas con ácido fólico

### 3.4.4. Estudios de captación en las células SKOV-3

Tal y como se puede apreciar en la Figura 12, se produjo una internalización más rápida en las formulaciones funcionalizadas con folato. En las formulaciones no funcionalizadas no se apreció una captación considerable hasta las 2 horas de incubación. Sin embargo, en nanopartículas con ácido fólico se observó incluso a los 30 minutos. Estas diferencias en la captación pueden atribuirse a la presencia del ácido fólico. Precisamente, la internalización a tiempos cortos obtenida con las nanopartículas de folato resulta muy interesante para nuestros objetivos debido a la rápida liberación del CBD a partir de las nanopartículas en los primeros 90 minutos. Sin embargo, tras 8 horas de incubación ambas formulaciones presentaron una captación similar.

### 3.4.5. Eficacia antitumoral de las nanopartículas de CBD en monoterapia

#### 3.4.5.1. Eficacia antitumoral *in vitro*

Mientras que las nanopartículas no cargadas no presentaron citotoxicidad, las nanopartículas cargadas con CBD (funcionalizadas y no funcionalizadas con ácido fólico) presentaron una

actividad antiproliferativa similar o ligeramente superior (a concentraciones bajas) al CBDsol (Figura 13). De hecho, se observó una disminución en los valores de  $CI_{50}$  en las formulaciones de nanopartículas de CBD. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 6). Cabe destacar que en estos ensayos el CBDsol está completamente disponible para las células lo que podría dificultar encontrar diferencias significativas entre la solución y las nanopartículas, en las que el CBD se libera de manera prolongada. De hecho, nanoformulaciones de otros agentes antitumorales presentaron resultados similares, mostrando una eficacia parecida e incluso en algún caso inferior al fármaco libre, probablemente debido a esta liberación controlada (55).

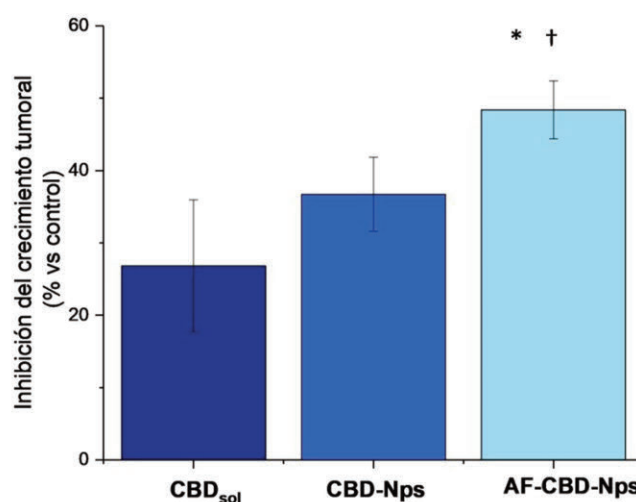


Figura 14: Inhibición del crecimiento tumoral de los diferentes tratamientos de las nanopartículas de CBD no funcionalizadas y funcionalizadas con ácido fólico. \* y † indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) de las nanopartículas funcionalizadas con el CBDsol y con las nanopartículas no funcionalizadas respectivamente

	$CI_{50}$	
	24 horas	48 horas
CBDsol	$29.71 \pm 1.89 \mu M$	$22.73 \pm 1.18 \mu M$
CBD-Nps	$28.04 \pm 1.14 \mu M$	$20.88 \pm 1.25 \mu M$
AF-CBD-Nps	$26.12 \pm 4.32 \mu M$	$17.63 \pm 3.27 \mu M$

Tabla 6: Valores de  $CI_{50}$  en las células SKOV-3 tras 24 y 48 horas de tratamiento con CBDsol y las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas de CBD

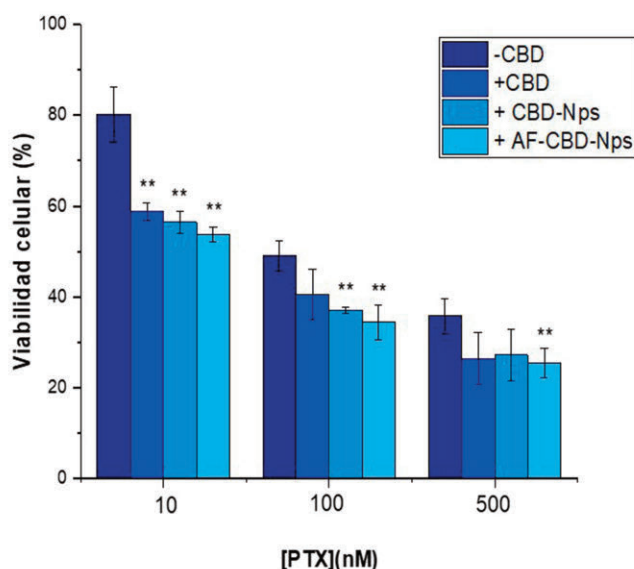


Figura 15: Actividad antiproliferativa del PTX administrado en monoterapia (-CBD) o en combinación con CBDsol (+CBD) y las formulaciones de nanopartículas de CBD no funcionalizadas (+CBD-Nps) y funcionalizadas con ácido fólico (+AF-CBD-Nps) siguiendo el protocolo de pre + co-administración a una concentración de CBD de 10 $\mu$ M

### 3.4.5.2. Eficacia antitumoral in vivo

La eficacia antitumoral de las nanopartículas de CBD desarrolladas también se evaluó en los modelos in ovo. Tal y como se puede observar en la Figura 14, las nanopartículas presentaron una mayor inhibición del crecimiento tumoral que el CBD<sub>sol</sub>. Sin embargo, diferencias estadísticamente significativas solo se observaron con las nanopartículas funcionalizadas. Esta mayor actividad antitumoral podría deberse a una mayor captación de las formulaciones debido a la presencia de ácido fólico. Cabe decir que este modelo es más representativo que los cultivos celulares en monocapa y permitiría apreciar mejor el proceso de vectorización. De hecho, otros autores han encontrado resultados similares con nanopartículas de otros agentes antitumorales funcionalizadas con ácido fólico, y mientras que en cultivos celulares las nanopartículas funcionalizadas presentaron una actividad antiproliferativa similar a las formulaciones no funcionalizadas, en estudios in vivo se observó una mayor eficacia, debido a una mayor captación (55-57).

	CI <sub>50</sub> PTX (nM)
PTX	105.52 $\pm$ 22.32
PTX + CBD <sub>sol</sub>	29.48 $\pm$ 6.82**
PTX + CBD-Nps	21.75 $\pm$ 6.01**
PTX + AF-CBD-Nps	18.53 $\pm$ 1.28** /†

Tabla 7: Valores de CI<sub>50</sub> del PTX combinado con CBD<sub>sol</sub> y las nanopartículas de CBD no funcionalizadas (CBD-Nps) y funcionalizadas con ácido fólico (AF-CBD-Nps). \*\* indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) en los valores de CI<sub>50</sub> del PTX administrado en monoterapia o junto con los diferentes formulaciones de CBD. † Indica diferencias estadísticamente significativas en los valores de CI<sub>50</sub> de PTX + CBDsol y PTX + AF-CBD-Nps

### 3.4.6. Estudios de combinación de la nanopartículas de CBD

Tal y como podemos observar en la Figura 15, las nanopartículas de CBD, administradas de acuerdo al protocolo de pre + coadministración, potenciaron la actividad antiproliferativa del PTX, disminuyendo significativamente ( $p < 0.01$ ) los valores de CI<sub>50</sub> de este antineoplásico (Tabla 7). Aunque ambas formulaciones de nanopartículas, no funcionalizadas y funcionalizadas con ácido, presentaron una mayor disminución de los valores de CI<sub>50</sub> que el CBD<sub>sol</sub>, solo se consiguieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico.

## 4. CONCLUSIONES

El CBD, administrado en monoterapia, resulta útil en el tratamiento de tumores de ovario altamente invasivos, debido a su capacidad para inhibir el crecimiento y migración de las células tumorales. Además, debido a su capacidad para potenciar el efecto citotóxico del paclitaxel, resulta útil su uso en terapia de combinación, permitiendo reducir la dosis, y por consiguiente, los efectos adversos de este antineoplásico para conseguir el mismo efecto antitumoral.

El desarrollo de las nanopartículas poliméricas de PLGA constituye un buen recurso tecnológico para administrar el CBD, presentando una actividad anticancerígena similar o ligeramente superior al CBD en solución. Además, la incorporación de ácido fólico a la superficie de estas formulaciones es un buen recurso de vectorización a tumores de ovario, incrementando significativamente la eficacia de las formulaciones de nanopartículas de CBD en los modelos in ovo. Además, estas formulaciones demostraron in vitro potenciar significativamente el efecto antitumoral del PTX.

## 5. LISTA DE ABREVIATURAS

AF-CBD-Nps	Nanopartículas cargadas con cannabidiol y funcionalizadas con ácido fólico
AF-DiO-Nps	Nanopartículas cargadas con DiO y funcionalizadas con ácido fólico
AF-PLGA-Nps	Nanopartículas blancas funcionalizadas con ácido fólico
CBD	Cannabidiol
CBD-Nps	Nanopartículas cargadas con cannabidiol
CBD sol	Cannabidiol en solución
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CIS	Cisplatino
DDE	Día de desarrollo embrionario
DiO	Perclorato de 3,3'-Diocetadeciloxacarbocianina
DiO-Nps	Nanopartículas cargadas con DiO

DOX	Doxorrubicina
EE	Eficacia de encapsulación
IC	Índice de combinación
MCA	Membrana corioalantoidea de embriones de pollo fecundados
PLGA	Poli-láctico-co-glicólico
PLGA-Nps	Nanopartículas blancas
PTX	Paclitaxel
PVA	Alcohol polivinílico

## 6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concesión de la ayuda para contratos predoctorales de Formación del Profesorado Universitario a Ana Isabel Fraguas Sánchez (Referencia FPU 14/06441).

## 7. REFERENCIAS

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
- Mizushima T, Miyamoto H. The Role of Androgen Receptor Signaling in Ovarian Cancer. *Cells*. 2019;8(2).
- Moufarrij S, Dandapani M, Arthofer E, Gomez S, Srivastava A, Lopez-Acevedo M, et al. Epigenetic therapy for ovarian cancer: promise and progress. *Clinical epigenetics*. 2019;11(1):7.
- Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Barroilhet L, Behbakht K, Berchuck A, et al. NCCN Guidelines Insights: Ovarian Cancer, Version 1.2019. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(8):896-909.
- Tsibulak I, Zeimet AG, Marth C. Hopes and failures in front-line ovarian cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;143:14-9.
- Chandra A, Pius C, Nabeel M, Nair M, Vishwanatha JK, Ahmad S, et al. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer medicine*. 2019.
- Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am*. 2014;32(1):167-203.
- Kalaydina RV, Bajwa K, Qorri B, Decarlo A, Szewczuk MR. Recent advances in "smart" delivery systems for extended drug release in cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:4727-45.
- Fraguas-Sanchez AI, Torres-Suarez AI. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*. 2018;78(16):1665-703.
- Pisanti S, Bifulco M. Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen. *Journal of cellular physiology*. 2018.
- !!! INVALID CITATION !!! {Fraguas-Sanchez, 2018 #3}.
- Daris B, Tancer Verboten M, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2019;19(1):14-23.
- Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;175:133-50.
- Cohen K, Weizman A, Weinstein A. Positive and Negative Effects of Cannabis and Cannabinoids on Health. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2019.
- McAllister SD, Soroceanu L, Desprez PY. The Antitumor Activity of Plant-Derived Non-Psychoactive Cannabinoids. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2015;10(2):255-67.
- Likar R, Nahler G. The use of cannabis in supportive care and treatment of brain tumor. *Neurooncol Pract*. 2017;4(3):151-60.
- Kiskova T, Mungenast F, Suvakova M, Jager W, Thalhammer T. Future Aspects for Cannabinoids in Breast Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).
- Pagano E, Borrelli F. Targeting cannabinoid receptors in gastrointestinal cancers for therapeutic uses: current status and future perspectives. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(10):871-3.
- Messalli EM, Grauso F, Luise R, Angelini A, Rossiello R. Cannabinoid receptor type 1 immunoreactivity and disease severity in human epithelial ovarian tumors. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2014;211(3):234.e1-6.
- Holland ML, Panetta JA, Hoskins JM, Bebwaw M, Roufogalis BD, Allen JD, et al. The effects of cannabinoids on P-glycoprotein transport and expression in multidrug resistant cells. *Biochemical pharmacology*. 2006;71(8):1146-54.
- Scott KA, Dalglish AG, Liu WM. Anticancer effects of phytocannabinoids used with chemotherapy in leukaemia cells can be improved by altering the sequence of their administration. *International journal of oncology*. 2017;51(1):369-77.
- Lopez-Valero I, Saiz-Ladera C, Torres S, Hernandez-Tiedra S, Garcia-Taboada E, Rodriguez-Fornes F, et al. Targeting Glioma Initiating Cells with A combined therapy of cannabinoids and temozolomide. *Biochemical pharmacology*. 2018;157:266-74.
- Lopez-Valero I, Torres S, Salazar-Roa M, Garcia-Taboada E, Hernandez-Tiedra S, Guzman M, et al. Optimization of a preclinical therapy of cannabinoids in combination with temozolomide against glioma. *Biochemical pharmacology*. 2018;157:275-84.
- Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarron CM, Morales-Calero MI, Navarrete F, Torres-Suarez AI, et al. Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addiction biology*. 2018;23(1):154-64.
- Fraguas-Sanchez AI, Martin-Sabroso C, Fernandez-Carballido A, Torres-Suarez AI. Current status of nanomedicine in the chemotherapy of breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*.



- 2019;84(4):689-706.
26. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;66:2-25.
27. Guan LY, Lu Y. New developments in molecular targeted therapy of ovarian cancer. *Discov Med*. 2018;26(144):219-29.
28. Gupta A, Kaur CD, Saraf S, Saraf S. Targeting of herbal bioactives through folate receptors: a novel concept to enhance intracellular drug delivery in cancer therapy. *J Recept Signal Transduct Res*. 2017;37(3):314-23.
29. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol*. 2017;137(2):e11-e6.
30. Kommineni N, Saka R, Bulbake U, Khan W. Cabazitaxel and thymoquinone co-loaded lipospheres as a synergistic combination for breast cancer. *Chemistry and physics of lipids*. 2018.
31. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*. 2010;70(2):440-6.
32. Van Hoesen K, Meynier S, Ribaux P, Petignat P, Delie F, Cohen M. Circulating GRP78 antibodies from ovarian cancer patients: a promising tool for cancer cell targeting drug delivery system? *Oncotarget*. 2017;8(63):107176-87.
33. Hernan Perez de la Ossa D, Ligresti A, Gil-Alegre ME, Aberturas MR, Molpeceres J, Di Marzo V, et al. Poly-epsilon-caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(3):927-32.
34. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS one*. 2014;9(9):e103988.
35. Hart S, Fischer OM, Ullrich A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer research*. 2004;64(6):1943-50.
36. McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(6):3281-9.
37. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(3):1375-87.
38. Fraguas-Sanchez AI, Fernandez-Carballido A, Torres-Suarez AI. Phyto-, endo- and synthetic cannabinoids: promising chemotherapeutic agents in the treatment of breast and prostate carcinomas. *Expert opinion on investigational drugs*. 2016;25(11):1311-23.
39. Elbaz M, Nasser MW, Ravi J, Wani NA, Ahirwar DK, Zhao H, et al. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. *Molecular oncology*. 2015;9(4):906-19.
40. Ramer R, Merkord J, Rohde H, Hinz B. Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochemical pharmacology*. 2010;79(7):955-66.
41. Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D. Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *British journal of pharmacology*. 2005;144(8):1032-6.
42. Ward SJ, McAllister SD, Kawamura R, Murase R, Neelakantan H, Walker EA. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT(1A) receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *British journal of pharmacology*. 2014;171(3):636-45.
43. Ward SJ, Ramirez MD, Neelakantan H, Walker EA. Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesthesia and analgesia*. 2011;113(4):947-50.
44. King KM, Myers AM, Soroka-Monzo AJ, Tuma RF, Tallarida RJ, Walker EA, et al. Single and combined effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *British journal of pharmacology*. 2017;174(17):2832-41.
45. Miyato H, Kitayama J, Yamashita H, Souma D, Asakage M, Yamada J, et al. Pharmacological synergism between cannabinoids and paclitaxel in gastric cancer cell lines. *J Surg Res*. 2009;155(1):40-7.
46. Fouad AA, Albuoli WH, Al-Mulhim AS, Jresat I. Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2013;36(2):347-57.
47. Hao E, Mukhopadhyay P, Cao Z, Erdelyi K, Holovac E, Liaudet L, et al. Cannabidiol Protects against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Modulating Mitochondrial Function and Biogenesis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;21:38-45.
48. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2017;70:97-101.
49. Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):9959-70.
50. Vu BT, Shahin SA, Croissant J, Fatieiev Y, Matsumoto K, Le-Hoang Doan T, et al. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Scientific reports*. 2018;8(1):8524.

51. Sharma D, Maheshwari D, Philip G, Rana R, Bhatia S, Singh M, et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken design: in vitro and in vivo evaluation. *Biomed Res Int*. 2014;2014:156010.
52. Jang JH, Jeong SH, Lee YB. Preparation and In Vitro/In Vivo Characterization of Polymeric Nanoparticles Containing Methotrexate to Improve Lymphatic Delivery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
53. Singh R, Kesharwani P, Mehra NK, Singh S, Banerjee S, Jain NK. Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity. *Drug development and industrial pharmacy*. 2015;41(11):1888-901.
54. Gupta A, Kaur CD, Saraf S, Saraf S. Formulation, characterization, and evaluation of ligand-conjugated biodegradable quercetin nanoparticles for active targeting. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(3):960-70.
55. Yao S, Li L, Su XT, Wang K, Lu ZJ, Yuan CZ, et al. Development and evaluation of novel tumor-targeting paclitaxel-loaded nano-carriers for ovarian cancer treatment: in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):29.
56. Luiz MT, Abriata JP, Raspantini GL, Tofani LB, Fumagalli F, de Melo SMG, et al. In vitro evaluation of folate-modified PLGA nanoparticles containing paclitaxel for ovarian cancer therapy. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2019;105:110038.
57. Ak G, Yilmaz H, Gunes A, Hamarat Sanlier S. In vitro and in vivo evaluation of folate receptor-targeted a novel magnetic drug delivery system for ovarian cancer therapy. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(sup1):926-37.

## DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Si desea citar nuestro artículo:  
Ana I. Fraguas , Ana I. Torres Suárez, et al  
**Quimioterapia nanométrica a base de cannabinoides  
para el tratamiento de tumores ginecológicos**  
An Real Acad Farm [Internet].  
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 2 (2020) : pp. 133-150  
DOI: <http://>





