



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

**DISEÑO DE UN MODELO EMPÍRICO PARA EL ANÁLISIS DE UN
PÉPTIDO INHIBIDOR DEL TRÁFICO DEL CANAL TRPM4 Y SU
POTENCIAL USO EN PACIENTES CON INCONTINENCIA URINARIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E INGENIERA
CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

FERNANDA IGNACIA SOTO MONTANDON

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE D.

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
RODRIGO ALZAMORA MIRANDA
ÓSCAR CERDA ARANCIBIA
BARBARA ANDREWS FARROW

ESTE TRABAJO HA SIDO PARCIALMENTE FINANCIADO POR:
FONDECYT 1160518

SANTIAGO DE CHILE
2020

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO
DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: **FERNANDA IGNACIA SOTO MONTANDON**
FECHA: 2020
PROF. GUÍA: JUAN ASENJO DE LEUZE D.

DISEÑO DE UN MODELO EMPÍRICO PARA EL ANÁLISIS DE UN PÉPTIDO INHIBIDOR DEL TRÁFICO DEL CANAL TRPM4 Y SU POTENCIAL USO EN PACIENTES CON INCONTINENCIA URINARIA

La incontinencia urinaria, conocida comúnmente como la pérdida involuntaria de orina, es una enfermedad caracterizada por afectar a la población masculina y femenina, siendo esta última la más perjudicada. Los pacientes con incontinencia urinaria ven afectada su calidad de vida en múltiples aspectos, los que van desde la necesidad de terapias psicológicas para tratar cuadros de angustia y ansiedad hasta grandes gastos económicos asociados directamente e indirectamente a la enfermedad. Debido a esto, un gran porcentaje de los afectados decide no reconocer su dolencia ni acceder a tratamientos.

Actualmente, el tratamiento de esta condición se basa en el uso complementario de terapia conductual y farmacológica, donde esta última es la más recomendada por los especialistas debido a la falta de información que corrobore la efectividad de los cambios conductuales. Pese al importante desarrollo de nuevas drogas dado en los últimos años, los fármacos existentes no pueden ser empleados en toda la población a causa de los variados efectos secundarios asociados a su uso, por lo que la mayoría de los pacientes deja el tratamiento antes de cumplir los seis meses lo que se traduce en la vuelta de la sintomatología completa. Frente a lo anterior, se propone diseñar un modelo empírico que permita analizar el potencial uso de un péptido inhibidor del tráfico del canal TRPM4 (péptido SWIP) como terapia farmacológica para pacientes con incontinencia urinaria.

En función de lo anterior, se realiza un análisis cualitativo de la penetración del péptido y las consecuencias morfológicas e histológicas del uso de este, además de cuantificar la razón de células por unidad de área del tejido muscular de animales tratados con el péptido SWIP, péptido SWIP modificado (Δ SWIP) y sin péptido. Al examinar los resultados obtenidos se determina que dentro de los efectos del uso de la droga se encuentra la hiperplasia del tejido muscular vesical, ya que al emplear el péptido SWIP, la razón determinada disminuye; siendo de 305, 270 y 174 células/mm² para tejidos musculares de animales tratados sin péptido, con péptido Δ SWIP y con péptido SWIP, respectivamente. Además, se recomienda una metodología para el estudio de contractilidad muscular y del tráfico del canal TRPM4; y se recomiendan algunas herramientas para facilitar el análisis de los resultados a obtener en los estudios futuros.

Posteriormente, se explicitan las fases a seguir y los análisis a realizar para el correcto desarrollo farmacológico del péptido SWIP y su aprobación por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA). Finalmente se diseña un sistema de producción recombinante del péptido SWIP y se analiza económicamente el sistema productivo mencionado anteriormente para la síntesis del péptido para a emplear en la fase clínica concluyendo que la síntesis recombinante es más rentable que la síntesis química (compra a empresas dedicadas a la síntesis química de péptidos) para requerimientos superior a los 14 gramos de fármaco.

*¿Pensaron alguna vez que si no
fuera por todos, nadie sería nada?*

Quino

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos aquellos que me han apoyado durante estos años. Primero que todo, agradecer a mi mamá por su entusiasmo y energía. Por enseñarme que las cosas requieren de sacrificio y paciencia. A mi papá por creer en mi y en mis capacidades. A mi papá Carlos, por enseñarme que vale más la familia y los buenos recuerdos que los siete. A mis hermanas, abuelos y a mi pareja, por darme sus sonrisas y apoyo en cada momento de dificultad; por creer en mi y darme una mano sin que se los pidiera.

A los profesores y funcionarios del DIQBM que me dieron la oportunidad de crecer como estudiante y como persona. Profesor Asenjo, muchas gracias por confiar en mi, por darme la posibilidad de desarrollar mi lado docente y por incentivar a tomar riesgos. Profe Álvaro, gracias por recordarme que es igual de importante ser valorado como persona que como ingeniera. A Ginita mi amiga y la mejor secretaria docente. Gracias por esos cafecitos y esas conversaciones interminables.

A los integrantes del Núcleo Milenio Minicad, por permitirme entrar a un mundo totalmente desconocido y enseñarme con paciencia. Profesor Óscar muchas gracias por darme la oportunidad de tomar este desafío y creer que sería capaz de llegar a la meta. Profesor Rodrigo muchas gracias por enseñarme semana a semana todo lo que necesitaba (y más) para lograr cumplir con las expectativas y realizar este proyecto. A Francisco, Raquel y Diego por ofrecer su ayuda cada vez que me veían con cara de pérdida y hacer que el tiempo en el laboratorio se pasara volando. Muchas gracias por responder mis dudas (por más tontas que fueran) y por darme su apoyo durante este proceso.

A Proyecto Tremün por darme la oportunidad de trabajar con gente tan maravillosa y sorprendente. Por recordarme lo importante que es jugar y reír. Por darme la oportunidad de ser niña otra vez. A enseñarme estar feliz aún cuando las cosas no suceden como yo lo había planificado.

A mis amigos del colegio gracias por estar siempre ahí, por hacerme sentir parte de sus vidas a pesar de la distancia. Gracias por esas juntas para ponerse al día que me hacen sentir que nunca me fui de casa.

A mis amigos de IQBT y plan común. Gracias por las sonrisas, los buenos momentos, las conversaciones y el apoyo incondicional. Gracias por hacerme sentir como en casa. Gracias por ser mi espacio de risas y llantos. Gracias por esos almuerzos que me hacían desconectarme y reír como nunca. Gracias por enseñarme que está en mis manos decidir si quiero trabajar para vivir o vivir para trabajar.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
2. Marco teórico	4
2.1. Incontinencia Urinaria	4
2.1.1. Vejiga y micción	4
2.1.2. Tipos de incontinencia urinaria	6
2.1.3. Hiperactividad vesical	7
2.1.4. Costos asociados a la Incontinencia Urinaria	8
2.1.5. Tratamiento actual	9
2.2. Contracción muscular	10
2.3. Canales de calcio	12
2.3.1. Canales de calcio activados por voltaje	12
2.3.2. Canales de calcio no activados por voltaje	13
2.4. Proteínas transmembrana activadas por calcio	14
2.4.1. Canales TRP	15
2.4.1.1. Canal TRPM4	16
3. Metodología	21
3.1. Penetración del péptido y consecuencias morfológicas	22
3.1.1. Inmunofluorescencia	22
3.1.2. Tinción hematoxilina-eosina (HE)	23
3.1.3. Análisis de resultados	24
3.1.3.1. Correlación TRPM4-HA	24
3.1.3.2. Densidad celular	24
3.2. Estudio de contractibilidad muscular	25
3.2.1. Pretratamiento	25
3.2.1.1. Cultivo organotípico	25
3.2.1.2. Medición de Tensión Isométrica	25
3.2.2. Curva de dosis respuesta	26
3.2.3. Análisis de datos	26
3.2.4. Cálculo EC ₅₀	26
3.3. Tráfico del canal TRPM4	26
3.3.1. Preparación del cultivo primario	27
3.3.2. Construcción sistema RUSH	27

3.3.3.	Detección del tráfico del canal TRPM4	28
3.3.4.	Análisis del tráfico del canal	28
3.4.	Etapas del desarrollo farmacológico	29
3.5.	Diseño Productivo y análisis de costos	29
3.5.1.	Sistema de producción	29
3.5.2.	Cálculo de costos asociados	30
4.	Resultados y discusión	32
4.1.	Penetración del péptido y efectos en morfología vesical	32
4.2.	Curva dosis-respuesta	36
4.3.	Determinación EC ₅₀	38
4.4.	Trafico canal TRPM4	40
4.5.	Desarrollo Farmacológico	40
4.6.	Diseño Productivo Preliminar	43
4.6.1.	Proceso de producción de la proteína recombinante	44
4.6.2.	Separación	46
4.6.3.	Lisis celular y separación	47
4.6.4.	Replegamiento y purificación del péptido	48
4.6.5.	Liofilización y envasado	50
4.7.	Costos de producción: Fase preclínica y clínica	52
5.	Conclusión	53
	Bibliografía	54
A.	Análisis del tráfico del canal TRPM4	61
A.1.	Código Matlab - Analisis.m	61
A.2.	Código Matlab - Analise.m	63
A.3.	Código Matlab - DrawFreehandRegion.m	64
A.4.	Código Matlab - Preguntar al usuario.m	66
A.5.	Código Matlab - Mensaje de precaución.m	66
B.	Tamaño de muestra y masa de péptido a producir para llevar a cabo el ensayo de tensión.	67
B.1.	Ecuaciones empleadas	67
B.2.	Datos empleados	68
B.3.	Memoria de cálculo	68
C.	Masa de péptido a producir para llevar a cabo el estudio de seguridad	70
C.1.	Ecuaciones empleadas	70
C.2.	Datos empleados	72
C.3.	Memoria de cálculo	72
D.	Calculo del volumen de cultivo	73
D.1.	Ecuación empleada	73
D.2.	Datos empleados	73
D.3.	Memoria de cálculo	73

E. Costos de inversión	74
F. Producción química péptido SWIP	75
G. Protocolo enviado al Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)	77

Índice de Tablas

3.1.	Anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la inmunofluorescencia del tejido vesical.	23
4.1.	Datos obtenidos experimentalmente para los tejidos de animales tratados sin péptido (control negativo).	34
4.2.	Datos obtenidos experimentalmente para los tejidos de animales tratados con péptido Δ SWIP.	34
4.3.	Datos obtenidos experimentalmente para los tejidos de animales tratados con péptido SWIP.	34
4.4.	Datos obtenidos para el análisis morfológico de los tejidos vesicales.	35
B.1.	Datos empleados para el cálculo de la masa de péptido.	68
C.1.	Datos empleados para determinar masa de SWIP a utilizar en estudio de seguridad.	72
D.1.	Datos empleados para el cálculo del volumen de cultivo.	73
E.1.	Datos análisis económico fermentación.	74

Índice de Ilustraciones

2.1.	Sistema de control de la vejiga.	5
2.2.	Morfología e histología de la vejiga.	5
2.3.	Mecanismo de contracción muscular.	11
2.4.	Estructura canales de alto umbral (HVA) de calcio.	13
2.5.	Mecanismos de activación canales de calcio.	14
2.6.	Estructura canales TRP.	15
2.7.	Familia de canales TRP.	16
2.8.	Efecto del canal TRPM4 sobre la concentración de calcio intracelular y el cambio de potencial de membrana.	17
2.9.	Motivo SWIP del canal TRPM4.	18
2.10.	Transporte del canal TRPM4.	19
2.11.	Mecanismo de acción péptido SWIP.	20
3.1.	Metodología inmunofluorescencia.	22
3.2.	Metodología tinción HE.	23
3.3.	Metodología del estudio de contractilidad.	25
3.4.	Metodología propuesta tráfico canal TPRM4.	27
4.1.	Inmunofluorescencia del tejido vesical.	33
4.2.	Histología del tejido vesical.	35
4.3.	Resultados esperados para la tensión vesical.	36
4.4.	Resultados esperados curva dosis respuesta.	37
4.5.	Curvas de dosis-respuesta para distintos fármacos.	38
4.6.	Curva EC ₅₀ para péptido SWIP.	39
4.7.	Estructura plasmidio pTXB1.	45
4.8.	Membrana de microfiltración de fibra hueca.	47
4.9.	Homogeneizador de alta presión.	48
4.10.	Esquema del sistema IMPACT.	49
F.1.	Cotización asociada a la producción química de péptido SWIP en Biomatik.	75
F.2.	Cotización asociada a la producción química de péptido SWIP en GenScript.	76

Capítulo 1

Introducción

La incontinencia urinaria (Urinary Incontinence, UI) corresponde a la pérdida involuntaria de orina, siendo la población femenina la más afectada, ya que en países en vías de desarrollo esta condición impacta al 26% de la mujeres.[1] La UI suele impactar múltiples aspectos de la vida de los pacientes, debido a que aumenta la probabilidad de desarrollar cuadros de angustia y ansiedad, además de disminuir la calidad de vida y traer consigo importantes gastos económicos. A pesar de que un gran porcentaje de la población padece esta enfermedad, solo una pequeña fracción se somete a tratamiento, esto debido a la vergüenza, desconfianza y/o temor asociado a las terapias actuales y sus efectos secundarios.

La UI se subdivide en tres categorías: incontinencia urinaria de estrés (SUI), incontinencia urinaria de urgencia (UIU) e incontinencia urinaria mixta (MUI). La primera corresponde a la pérdida de orina provocada por el incremento en la presión abdominal debido a algún esfuerzo muscular. La segunda se debe a la hipercontractilidad de la vejiga y se caracteriza por el constante deseo de orinar; y la incontinencia urinaria mixta corresponde a la mezcla de ambas condiciones y usualmente los pacientes afectados con esta patología son sometidos al mismo tratamiento que los pacientes con SUI. (Ver apartado 2.1 del documento).

La salida de orina de la vejiga se genera por la acción conjunta de la uretra y el músculo detrusor, ya que durante el vaciado vesical, este músculo se contrae y el esfínter se relaja para facilitar la salida de orina. Luego de múltiples estudios, se logró determinar que la contracción del músculo liso, está directamente relacionada con el incremento de la concentración de calcio intracelular. Debido a lo anterior, es de suma importancia estudiar los factores que desencadenan el incremento en la concentración de calcio intracelular, tanto por la entrada directa de este o por la liberación del ion desde sus organelos de almacenaje intracelular.

Actualmente, los médicos especialistas recomiendan dos tipos de tratamientos para disminuir los síntomas de la incontinencia urinaria de urgencia: el cambio de hábitos de vida y la terapia farmacológica. A pesar del masivo uso del cambio de hábitos, no existe suficiente información sobre la efectividad de este, por lo que usualmente se emplea en conjunto a la terapia farmacológica. Lamentablemente, esta última posee múltiples efectos secundarios debido a que los fármacos empleados actúan de manera inespecífica sobre receptores que están presentes en varios tipos de tejidos, y no solo en el músculo detrusor. En la mayoría de los pacientes, el uso de estas drogas provoca dolor de cabeza, sequedad ocular, sensación de mareo e insomnio, y es capaz de afectar la capacidad del paciente para conducir. Debido a

esto, la mayoría de las personas sometidas a terapia farmacológica abandona el tratamiento antes de los 6 meses.[2]

Los múltiples efectos secundarios que poseen los medicamentos empleados actualmente para tratar la UUI, y la falta de información respecto a las terapias alternativas, incentivó al grupo investigador a llevar a cabo el estudio de un nuevo fármaco que permita disminuir la hiperactividad del músculo detrusor y que genere un menor número de efectos secundarios.

Específicamente, en este documento se propondrá una metodología para analizar de manera empírica el efecto de un péptido (denominado SWIP, en adelante) como tratamiento farmacológico en pacientes con incontinencia urinaria. Específicamente, y con el fin de evaluar las consecuencias morfológicas e histológicas de la penetración del péptido, se extrajeron tejidos vesicales de animales tratados con péptido SWIP, péptido Δ SWIP y sin péptido; y se analizaron mediante técnicas de inmunofluorescencia y la tinción de tejido. Asimismo, se proponen estudios para determinar el efecto del péptido sobre la respuesta contráctil dentro de los cuales, destaca el análisis del comportamiento *in vitro* de tejidos vesicales frente estímulos de acetilcolina (un inductor de la contracción del detrusor). Se propone realizar esto en tejidos vesicales pretratados con distintas concentraciones de péptido SWIP para determinar las curvas dosis-respuesta del sistema y calcular la concentración de fármaco que inhibe el 50 % de la contracción vesical (EC_{50}). Una vez determinado este parámetro, se plantea llevar a cabo el estudio de farmacocinética y farmacodinamia del péptido por medio de estudios *in vitro*. Además, se propone describir el mecanismo de transporte del canal TRPM4, desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática, mediante el uso de la técnica RUSH en tres contextos diferentes: inhibiendo la proteína EB1, EB2 y EB3, respectivamente.

Puesto que el objetivo final de este proyecto corresponde a la creación de un nuevo tratamiento farmacológico para pacientes con incontinencia urinaria, se describen claramente las fases del desarrollo farmacológico y los análisis a realizar en cada una de estas para permitir así la aprobación por parte de la FDA.

Finalmente, se presenta un sistema de producción industrial del fármaco, basado en la síntesis recombinante de este. Para esto se analizan las etapas de síntesis, concentración, purificación y envasado del péptido. Además, de realizar un análisis de costos y evaluar la rentabilidad del proceso.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Formular un modelo empírico sobre el efecto inhibitorio del péptido SWIP en la contracción del músculo detrusor de la vejiga y los posibles costos asociados a la producción.

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características morfológicas e histológicas producidas por el péptido en el tejido vesical.
- Establecer un modelo cuantitativo del efecto inhibitorio del péptido sobre la respuesta contráctil efectuada por la acetilcolina sobre el músculo detrusor.
- Realizar el diseño y la evaluación económica de un proceso de producción del péptido para su estudio preclínico.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Incontinencia Urinaria

La incontinencia urinaria corresponde a la pérdida involuntaria de orina y afecta tanto en mujeres como hombres, siendo la población femenina la más afectada a nivel mundial.[3] Lamentablemente, no es posible indicar con seguridad el número de personas que padecen de esta enfermedad, ya que la mayoría de los afectados se sienten avergonzados y deciden ocultarla. De hecho, un gran porcentaje de la sociedad cree que la incontinencia urinaria es parte de envejecer y desconocen que esta puede ser tratada.

Con el fin de facilitar la comprensión por parte de la sociedad y oficializar la definición de incontinencia urinaria, en el año 2002, la Sociedad Internacional de Continencia (ICS) procedió a describir esta enfermedad como la “queja de cualquier pérdida involuntaria de orina”. La formalización de esta dolencia aumentó el número de investigaciones en torno a la incontinencia urinaria y la aceptación social de esta. [1] Más aún, esta enfermedad ha generado mucho revuelo últimamente, ya que es una condición que genera angustia y ansiedad en los pacientes, y afecta la calidad de vida de forma psicológica como física, además de llevar consigo gastos económicos considerables. Estos últimos serán descritos en mayor detalle en la sección 2.1.4.

2.1.1. Vejiga y micción

La vejiga es un órgano hueco músculo-membranoso que forma parte del aparato urinario, junto a los uréteres, la uretra y los riñones. Este órgano se encuentra en la parte central de la pelvis y cumple la función de acumular la orina formada por los riñones. El volumen de almacenaje de orina de este órgano puede variar entre los 300 - 400 [mL] para un adulto; y una de sus características principales, corresponde a su capacidad de distenderse hasta su volumen máximo, sin modificar su presión interna. [4] En la figura 2.1 se muestra la vejiga y el conducto uretral, además de los principales músculos del aparato urinario inferior.

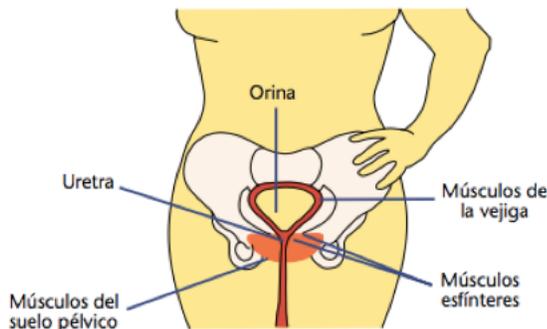


Figura 2.1: Sistema de control de la vejiga.

Presenta el sistema urinario inferior femenino y los músculos asociados a la micción. En color rojo se presenta la uretra, y los músculos del suelo pélvico se destacan en color naranja.

Extraído de [5].

La pared vesical está compuesta por tres capas: peritoneal, muscular, y mucosa y submucosa; donde la primera de estas corresponde a la superficie exterior de la vejiga; y la capa de mucosa y submucosa corresponden a las capas internas de la vejiga, que mantienen contacto directo con la orina durante su almacenamiento. Por su parte, la lámina muscular esta formada por tres subcapas: la externa, compuesta por fibras musculares longitudinales, la media, formada por fibras circulares y la capa interna, caracterizada por la presencia de fibras longitudinales al igual que la externa. [6] Esta división estructural se presenta de manera detallada en la figura 2.2.

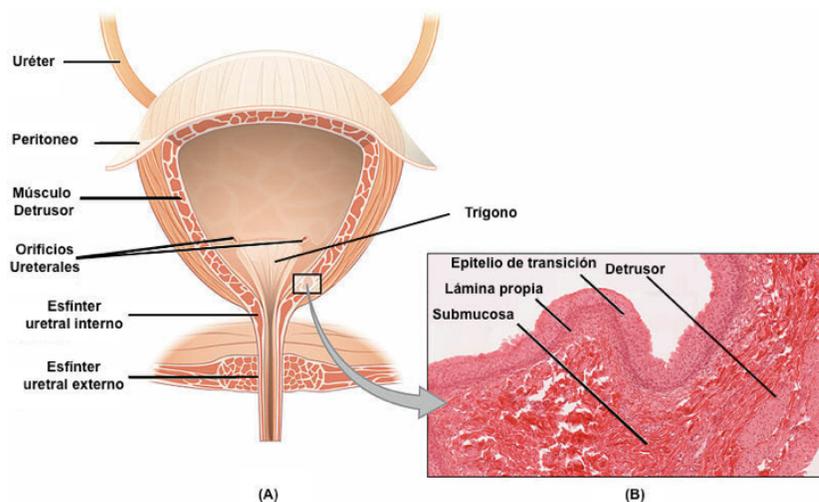


Figura 2.2: Morfología e histología de la vejiga.

(A) representa la morfología de la vejiga, (B) indica la histología del tejido de la vejiga, es posible vislumbrar las tres capas que la componen. Modificado de [7].

La capa muscular externa de la vejiga también conocida como músculo detrusor, tiene la capacidad de relajarse o contraerse según la fase de micción y las condiciones externas; es decir, puede relajarse para permitir el llenado de la vejiga y contraerse para liberar su contenido. La micción posee dos etapas bien diferenciadas: el vaciado de la vejiga y el llenado de esta. Durante la etapa de vaciado, el esfínter externo se relaja de forma voluntaria, la uretra se abre y la musculatura de la vejiga se contrae al mismo tiempo que se relaja el cuello vesical; por el contrario, en la etapa de llenado, la musculatura se encuentra relajada y el esfínter externo está contraído. [5]

Normalmente, el proceso de liberación de orina se produce cada 3 o 4 horas dependiendo del volumen de líquido ingerido y la capacidad de almacenamiento de la vejiga. Otro aspecto importante que afecta el vaciado de la vejiga corresponde al ambiente, ya que este proceso se caracteriza por llevarse a cabo solo cuando el contexto social y el lugar son adecuados. Múltiples estudios epidemiológicos indican que una tasa de micción igual o superior a las 8 micciones diarias provoca un efecto negativo importante en la calidad de vida de las personas, por lo que el desarrollo de nuevas investigaciones en torno a la búsqueda de innovadoras terapias ha cobrado un rol significativo en los últimos años. [8]

El músculo detrusor, presentado en la figura 2.2.A y detallado en la figura 2.2.B, es controlado por el sistema nervioso autónomo (SNA), específicamente, por el sistema nervioso parasimpático. Este último actúa estimulando los receptores muscarínicos de la vejiga, así cuando la orina llena la vejiga, los receptores M3 localizados en la vejiga son activados, generando la contracción del detrusor. Por otra parte, la estimulación de los receptores M2 produce una reducción del adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) presente en las células musculares, lo que previene la relajación vesical. Una vez que la vejiga está vacía y las fibras contráctiles se encuentran inactivas, el sistema nervioso simpático estimula la activación de los receptores $\beta - 3$, mediante la liberación de noradrenalina y el aumento del cAMP, lo que desencadena la relajación del detrusor y el inicio de un nuevo ciclo de micción.

Por otro lado, la activación de las proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico (PKA) atenúan la excitabilidad y contractibilidad del músculo liso activando los canales de potasio dependientes de calcio. Al activar este tipo de canales, el flujo de salida de potasio es mayor, lo que genera la hiperpolarización de la membrana y el cierre de los canales de calcio, en otras palabras, son capaces de cambiar el potencial de la membrana. El cierre de canales de calcio provoca la disminución del calcio intracelular y la consiguiente relajación del músculo liso. [9]

2.1.2. Tipos de incontinencia urinaria

Actualmente, la incontinencia urinaria se clasifica en tres grandes categorías: incontinencia urinaria de esfuerzo (Stress Urinary Incontinence, SUI), incontinencia urinaria de urgencia (Urgency Urinary Incontinence, UUI) e incontinencia urinaria mixta (Mixed Urinary Incontinence, MUI). El primer tipo, corresponde a aquella pérdida involuntaria de orina provocada por situaciones de esfuerzo muscular, tales como toser, saltar o reír, en las que se incrementa la presión abdominal y, por ende, la presión en la vejiga. Usualmente, este tipo de incontinencia se caracteriza por la presencia de daño en los esfínteres uretrales y/o de los músculos

pélvicos, lo que disminuye la capacidad de almacenaje de orina, provocando la liberación descontrolada de esta. Existen dos grandes causas para la incontinencia urinaria de esfuerzo, las cuales pueden presentarse de forma conjunta o independiente. Concretamente, la primera corresponde a la disfunción intrínseca del esfínter provocada por la insuficiente coaptación de las paredes uretrales, dada la debilidad del músculo uretral. Por otro lado, la segunda causa, corresponde a la hipermovilidad uretral que se caracteriza por la debilidad en las estructuras que conforman el suelo de la pelvis y que sostienen la uretra, lo que ocasiona el exceso de movilidad de esta y la pérdida de orina. [10][5]

El segundo tipo de incontinencia corresponde a la incontinencia urinaria de urgencia, y se asocia al fuerte y constante deseo de orinar debido a la contractibilidad aumentada de la vejiga por la contracción involuntaria del músculo detrusor. Este tipo de incontinencia puede clasificarse en incontinencia urinaria de urgencia sensitiva e incontinencia de urgencia motora. La primera corresponde a la detección de impulsos por parte de los receptores internos de tensión/presión ubicados en la pared vesical. Frente a estos estímulos, se desencadena la liberación de neurotransmisores que envían la señal de vaciado de la vejiga, aún cuando el volumen de orina almacenado es reducido. Por otra parte, la incontinencia de urgencia motora se debe a la hiperactividad del músculo detrusor, la cual es provocada por el incorrecto funcionamiento de las vías de señalización que permiten la inhibición motora del reflejo de micción.

El tercer tipo de incontinencia urinaria corresponde a la incontinencia mixta; esta enfermedad está caracterizada por la pérdida de orina debido a la presencia conjunta de incompetencia esfinteriana e hiperactividad del músculo detrusor. [10] Los pacientes con este tipo de incontinencia suelen presentar síntomas más severos y tener una menor respuesta ante los tratamientos farmacológicos que los pacientes con SUI y UUI; además, de presentar menores tasas de éxito ante intervenciones quirúrgicas realizadas comúnmente en el tratamiento de la incontinencia urinaria de estrés.

2.1.3. Hiperactividad vesical

Al observar de manera detallada el estímulo de micción, este puede ser analizado como un proceso en que el circuito nervioso, el cerebro y la médula espinal actúan de manera conjunta y coordinada, para controlar la actividad del músculo liso en la vejiga y la uretra. Este actuar es posible gracias a la presencia de células del sistema nervioso parasimpático y del simpático. Concretamente, los nervios pélvicos parasimpáticos están involucrados en la contracción de la vejiga y la relajación de la uretra. Por otra parte, los nervios lumbares simpáticos están vinculados con la relajación del cuerpo de la vejiga, y el nervio pudendo, además de la estimulación del esfínter uretral externo. Durante la fase de llenado, el sistema nervioso simpático y el pudendo están activados, para mantener la uretra cerrada, y el sistema nervioso parasimpático se encuentra inhibido para facilitar la relajación de la vejiga. Por el contrario, en la fase de evacuación los roles se encuentran invertidos, ya que el sistema nervioso parasimpático está activo y el sistema nervioso simpático y el pudendo están inactivos. [11]

El principal neurotransmisor responsable de la señalización del impulso nervioso asociado a la micción, y la posterior contractibilidad vesical corresponde a la acetilcolina. Esta molécula activa los receptores muscarínicos presentes en los miocitos del detrusor y provoca el

incremento de la concentración de calcio intracelular. Actualmente, se han identificado 5 tipos distintos de receptores muscarínicos para acetilcolina, localizados en el urotelio, las células intersticiales, las fibras nerviosas y el músculo detrusor. Particularmente en este último, los subtipos predominantes corresponden al tipo M2 y M3 con un porcentaje de dominancia de aproximadamente 75 % y 25 %, respectivamente. A pesar de que los receptores tipo M3 se encuentran en menor proporción en el detrusor, se cree que estos cumplen un rol principal en la contracción de la vejiga; puesto que en estudios realizados anteriormente se descubrió que la unión entre acetilcolina y los receptores M2 genera la relajación del músculo detrusor, proceso contrario a la contracción muscular.

Existen dos grandes factores asociados a la hiperactividad vesical: el factor miogénico y el neurogénico. Específicamente, en aquellos pacientes cuya enfermedad está desencadenada por un factor miogénico, la hiperactividad se caracteriza por la generación de una mayor potencia contráctil frente a la activación de las fibras musculares. Esto surge como consecuencia de los potenciales autónomos espontáneos de actividad del Ca^{2+} celular, y las oscilaciones de membrana originadas a partir de la afluencia extracelular y la liberación intracelular de Ca^{2+} en las células del músculo liso. Estos cambios morfológicos pueden estar relacionados con la edad o ser resultado de daño nervioso y/o lesiones en estos. [12] Por otro lado, si la enfermedad está relacionada a factores neurogénicos, los daños en las vías inhibitorias del cerebro y la médula espinal, o la sensibilización de terminales de la superficie de la vejiga pueden provocar la hiperactividad del músculo liso.

2.1.4. Costos asociados a la Incontinencia Urinaria

La incontinencia urinaria de urgencia es uno de los síntomas principales del síndrome de la vejiga hiperactiva (OAB), y debido a la dificultad existente para dividir estas poblaciones en dos grupos aislados, la determinación de datos estadísticos con respecto al número de afectados de UUI no es exacta, y la información publicada en las principales revistas de urología del mundo corresponde a datos del síndrome OAB y no de UUI en particular.

La UUI es una patología que afecta la calidad de vida de los pacientes en múltiples ámbitos, restringiendo la realización de actividades cotidianas en base a la existencia y facilidad de acceso a sanitarios. Las actividades e interacciones sociales, al igual que las interacciones interpersonales, se ven afectadas debido a la constante sensación de inseguridad y vergüenza. Esto disminuye el bienestar psicológico, y aumenta las tasas de depresión y ansiedad en individuos con UUI en comparación con aquellos que no poseen esta enfermedad. Además del alto efecto emocional, esta enfermedad trae consigo un importante impacto económico. De hecho, durante un estudio realizado en Estados Unidos en el año 2007, se determinó que el costo nacional del OAB fue de 66 billones de dólares, lo que correspondía al 3 % del gasto nacional total en salud de ese año (2007). De esos 66 billones, 52 billones de dólares estaban asociados a costos directos y los 14 billones restantes correspondían a gastos indirectos de la enfermedad. [13]

Los costos vinculados a esta enfermedad se pueden separar en costos directos e indirectos, como se menciona anteriormente; donde los primeros corresponden a los cuidados de rutina tales como la compra de suplementos para la incontinencia, el costo en lavado y el secado, y los costos relacionados al tratamiento farmacológico de la enfermedad. Por otro lado, los

costos indirectos corresponden a aquellos atribuibles a la enfermedad pero no pertenecientes al síndrome de OAB. Dentro de los costos indirectos más comunes destacan las infecciones del tracto urinario, infecciones en la piel y hospitalizaciones varias. En el estudio mencionado anteriormente, se determinó que el costo anual promedio per cápita de los gastos directos e indirectos, correspondía a \$1.477 y \$426 dólares americanos, respectivamente. [14] Al analizar de manera específica el origen de los costos per cápita, se observa que el 75 % de estos corresponden a gastos médicos directos, el 22 % corresponde a la disminución en la productividad del paciente y el 4 % restante a los costos indirectos no médicos. [15]

En base al estudio realizado en el año 2007, y estimando los costos asociados al síndrome OAB, se prevé que el gasto nacional por OAB de Estados Unidos para el año 2020 corresponderá a 82,6 billones de dólares. Cabe destacar que se espera que el valor real sea mayor que el pronosticado, ya que se considera que los gastos sufrirán un incremento del 25 %, y que aumentará la población con UUI en un 25 %, en comparación al año 2007, debido al envejecimiento de la sociedad. Otros factores capaces de alterar la predicción del gasto nacional corresponden al alto costo anual de cuidados especiales para un individuo perteneciente a la población mayor de 85 años (aproximadamente US\$5.780) y la omisión en el estudio de los costos asociados a incontinencia urinaria de esfuerzo. [14]

2.1.5. Tratamiento actual

En los últimos estudios realizados, se registra que para los adultos mayores de 18 años, el predominio de cualquier tipo de UUI varía entre el 1,5 % - 14,3 % para la población masculina y entre 1,6 % y 22,8 % para la población femenina. Por otro lado, los estudios realizados en adultos mayores de 30 años indican que para este grupo en particular, el porcentaje varía de 1,7 % a 13,3 % en hombres, y entre 7 % y 30,3 % en mujeres. [3]

Como se puede inferir del párrafo anterior, la UUI es una enfermedad común en hombres y mujeres de diversas edades. Lamentablemente, esta enfermedad puede afectar severamente la calidad de vida de los pacientes y desencadenar enfermedades psicológicas graves. Con el fin de disminuir estos efectos indeseados, se han desarrollado diversos tratamientos, dentro de los cuales el más empleado por los pacientes (pero menos recomendado por los especialistas), corresponde al cambio en los hábitos de vida en combinación con una terapia farmacológica para controlar la contracción del músculo detrusor y la actividad uroterial. [2] En el tratamiento conductual, el principal cambio recomendado por profesionales corresponde a la disminución del consumo de líquidos, específicamente de bebidas carbonatadas y con altas concentraciones de cafeína, además del entrenamiento diario de los músculos pélvicos. A pesar de ser una de las terapias más aplicadas, no existe suficiente información sobre la efectividad de este tratamiento y de los niveles de adherencia al tratamiento, por lo que suele usarse como complemento de la terapia farmacológica y no solo.

Con respecto a la terapia farmacológica, la mayoría de los tratamientos actúan bloqueando los receptores muscarínicos encargados de detectar la acetilcolina y desencadenar el aumento de calcio intracelular. Estos medicamentos, más conocidos como anticolinérgicos, corresponden a la primera opción de tratamiento farmacológico, sin embargo, debido a sus múltiples efectos secundarios, no pueden ser utilizados por toda la población. Por esta razón, es necesario realizar un balance previo entre los efectos adversos, los síntomas de la enfermedad y

la eficiencia clínica del fármaco antes de iniciar tratamiento con este tipo de drogas. [16]

Dentro de los medicamentos anticolinérgicos, la oxibutinina corresponde a la principal droga recomendada por especialistas para el manejo de la UUI. Si bien este fármaco posee mayor afinidad por los receptores M1 y M3 que por los M2, sus efectos secundarios, tales como la sequedad bucal, el incremento de accidentes y caídas en pacientes de edad, y las múltiples consecuencias cognitivas hacen que solo una minoría de los pacientes puedan mantener el tratamiento por más de 6 meses. [17][2]

La tolterodina corresponde a otro de los medicamentos empleados en esta enfermedad. Este fármaco presenta una mayor selectividad por los receptores muscarínicos presentes en la vejiga que por aquellos ubicados en las glándulas salivales, sin embargo los pacientes han presentado varios efectos secundarios, dentro de los cuales destacan la sensación de mareo, somnolencia, dolor de cabeza y sequedad ocular. [18]

Otros fármacos antimuscarínicos empleados en el tratamiento de la UUI son el trospio, la solifenacina y la darifenacina. A pesar de que estos medicamentos inhiben competitivamente los receptores M3, estas proteínas de membrana se encuentran en varios tejidos como el tejido glandular, muscular, endotelial y nervioso, lo que genera que los medicamentos mencionados anteriormente tengan grandes efectos secundarios dentro de los cuales destacan las náuseas, taquicardia, dolor abdominal, trastornos obstructivos gastrointestinales, sequedad ocular y bucal e insomnio; además de afectar la capacidad de conducir del paciente. [19][20][21]

La última adición al tratamiento farmacológico de la incontinencia urinaria de urgencia corresponde al mirabegrón. Este es el primer fármaco comercializado que actúa como agonista selectivo de los receptores beta 3 adrenérgicos de la vejiga, estimulando a estos receptores y aumentando la concentración de cAMP. Gracias a que estos receptores no se encuentran en las glándulas salivales, este medicamento no posee los mismos efectos secundarios que los fármacos muscarínicos. Sin embargo, esta droga no está exenta de efectos indeseados, ya que los receptores beta 1 y beta 2 se encuentran en el corazón y se ven afectados por el uso de mirabegrón, lo que prohíbe su uso en pacientes hipertensos o con arritmias cardíacas. Esto genera un gran problema, puesto que en el 2015 existían aproximadamente 1.130 millones de personas hipertensas en el mundo y se pronostica un aumento constante de individuos con esta enfermedad. Además, los receptores beta 3 están presentes en el tejido adiposo, en donde estimulan la lipólisis y provocan la pérdida de peso. Asimismo, este fármaco tampoco está recomendado para pacientes con insuficiencia renal ni insuficiencia hepática, lo que disminuye considerablemente el público objetivo. [22][23]

2.2. Contracción muscular

El calcio intracelular actúa como segundo mensajero frente a estímulos externos e internos de la célula cumpliendo un rol fundamental en la contracción muscular. En este caso en particular, el ion Ca^{2+} interactúa con proteínas reguladoras que en ausencia del catión previenen la interacción entre las fibras de actina y miosina. Al producirse un incremento en la concentración de calcio intracelular este forma un complejo con las proteínas inhibitorias, lo que facilita la interacción entre las fibras de actina y la miosina, permitiendo la formación de actomiosina y desencadenando la contracción muscular.

En el músculo liso, a diferencia del músculo esquelético y cardíaco, el ciclo de contracción y relajación está ligado a procesos de desfosforilación y fosforilación regulados por la concentración de calcio intracelular, y mediados por enzimas fosfatasas y quinasas, respectivamente.[24] El incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular puede deberse al ingreso del ion mediante canales dependientes de voltaje y/o la liberación de este desde los depósitos intracelulares. Una vez que aumenta la concentración de calcio intracelular, este se une a la enzima calmodulina provocando el cambio conformacional de ella, lo que permite que ahora pueda fosforilar otras proteínas y controlar la actividad de estas. El complejo Ca^{2+} -calmodulina activa la quinasa MLCK (por sus siglas en inglés, Quinasa de la Cadena Ligera de la Miosina), que fosforila la cadena ligera de miosina localizada en la cabeza de esta (región de unión a actina). La fosforilación de miosina genera un cambio conformacional en ella, el cual facilita la estimulación de la actividad enzimática de la miosina ATPasa por parte de la actina, produciendo la contracción muscular. [25]

La contracción muscular también puede ocurrir en ausencia de cambios en la concentración de calcio intracelular, mediante la vía RhoA/Rho quinasa (ROCK). Esto se produce ya que, en estado de relajación, la proteína RhoA se encuentra unida a una GTPasa de manera inactiva, y ante el estímulo externo de contracción se une a la enzima Rho quinasa de la membrana celular activando la proteína Rho-GTP. Posteriormente, el complejo Rho-GTP activo se asocia con ROCK en la membrana y la activa. Esta última, en su forma activa, fosforila la enzima MLCP (por sus siglas en inglés, Fosfatasa de la Cadena Ligera de la Miosina) inactivándola, favoreciendo la actividad de MLCK y permitiendo la contracción del músculo liso. [24] Este proceso se ve facilitado por la activación de la enzima FAK (por sus siglas en inglés, Quinasa de Adhesión Focal) que transmite la fuerza generada por la activación del miofilamento a la matriz extracelular y al resto del tejido muscular. El proceso de contracción muscular mencionado anteriormente se expone en la figura 2.3.

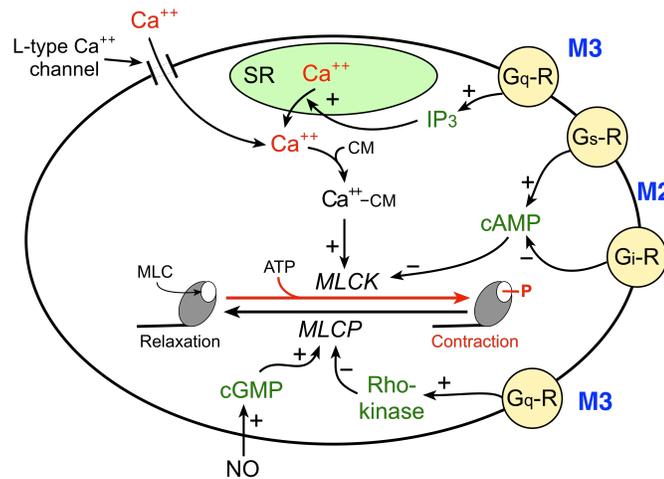


Figura 2.3: Mecanismo de contracción muscular.

Representa el sistema de contracción producido ante el incremento de calcio intracelular y/o frente a la activación de Rho-GTP. Los canales muscarínicos M2 y M3 están identificados en color azul y corresponden a los receptores de membrana Gq y Gi, respectivamente. Modificado de [26].

Otro mecanismo que estimula la contracción del detrusor corresponde a la acción conjunta de las enzimas FAK/Rac, ya que la proteína FAK activa a la proteína Rac 1, donde Rac 1 es una de las proteínas pertenecientes a la familia de Rho-GTPasas. [27]

2.3. Canales de calcio

Múltiples procesos celulares, tales como la secreción de neurotransmisores, el crecimiento celular y la migración celular, así como la ya mencionada contracción muscular, están ligados directamente con la concentración de calcio dentro de la célula. La concentración de este ion en el compartimiento intracelular depende directamente de la acción de canales de calcio que transportan el catión Ca^{2+} desde y hacia el interior de las células por medio de proteínas integrales de membrana. Las proteínas de membrana capaces de transportar calcio se pueden dividir según el mecanismo de excitación, separándose en 4 tipos: canales activados por voltaje (VOC), canales activados por receptores (ROC), canales activados por segundos mensajeros (SMOC) y canales activados por depósitos (SOC). Particularmente, el primer mecanismo mencionado es dominante en células excitables y los últimos 3 son dominantes en células no excitables. [28]

2.3.1. Canales de calcio activados por voltaje

Los canales de calcio activados por voltaje se abren ante una brusca despolarización de la membrana plasmática, generando la rápida entrada de cationes a la célula a favor del gradiente electroquímico. Este proceso se ve favorecido, ya que la concentración intracelular de calcio es aproximadamente 10.000 veces menor que la existente en el medio extracelular, teniendo un valor aproximado de 100 nM y 100 mM, respectivamente. Como el flujo de iones es un proceso ligado al voltaje, una vez que se repolariza la membrana plasmática los canales se cierran para impedir el paso del ion. [28]

Los VOC pueden agruparse conforme a sus propiedades biofísicas y farmacológicas o según su umbral de activación. Al clasificarlos según el umbral de activación, se pueden obtener dos grandes grupos: los canales de alto umbral (HVA) y los de bajo umbral (LVA). La diferencia entre los canales LVA y los HVA radica en que estos últimos forman complejos heteromultiméricos asociando tres subunidades auxiliares ($\beta, \alpha_2 - \delta, \gamma$) con la subunidad α_1 para asegurar la activación y desactivación del canal, así como la expresión e incorporación de este a la membrana del canal iónico. [29][30] En la figura 2.4 se presenta la estructura de los canales VOC (HVA).

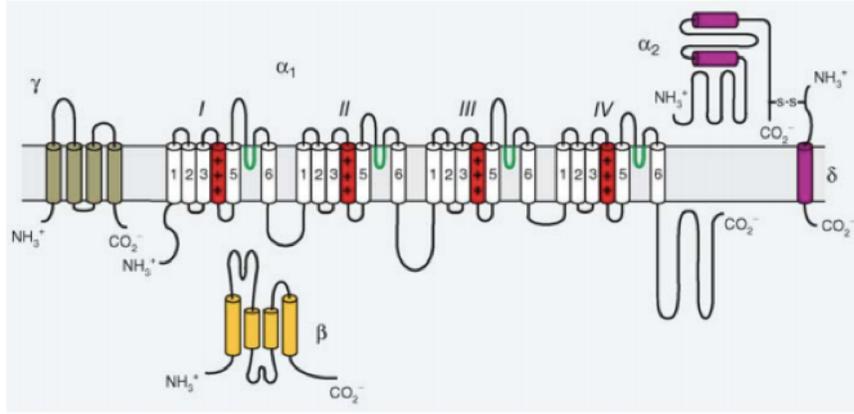


Figura 2.4: Estructura canales de alto umbral (HVA) de calcio.

Presenta los dominios y subunidades que componen este tipo de canales. Los segmentos transmembrana de cada dominio están enumerados del 1 al 6, de izquierda a derecha. La cadena aminoacídica que conforma el poro entre los segmentos 5 y 6 de cada dominio se encuentra marcada en color verde y las subunidades auxiliares, β , $\alpha_2 - \delta$, γ están representadas por los colores amarillo, morado y verde, respectivamente. Extraído de [29].

2.3.2. Canales de calcio no activados por voltaje

Con respecto a los canales no activados por voltaje, la activación de los ROC se debe a la unión de un agonista al receptor extracelular, lo que permite la apertura del canal, y la entrada y/o salida de calcio. Asimismo, la actividad de los SOC depende de ciertas moléculas que son liberadas al interior de la célula, y que actúan como segundos mensajeros iniciando la reacción en cadena y provocando transporte de calcio. Por otro lado, los canales activados por depósito, se abren tras el vaciamiento de los acopios intracelulares de calcio; principalmente por la liberación del calcio almacenado en el retículo endoplásmico. Este proceso inicia con la síntesis y difusión de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en el citoplasma como consecuencia de una señal externa. Una vez que el IP_3 llega a los canales de calcio ubicados en la membrana del ER, esta molécula activa los canales y produce la liberación del catión.[31]

La liberación de Ca^{2+} es un mecanismo de reacción celular denominado respuesta SOCE (por sus siglas en inglés, Entrada de Calcio Dependiente de Depósito), y es particularmente importante en células excitables, aunque también está relacionado funcionalmente con orgánulos intracelulares que participan en la homeostasis del calcio intracelular. [28] Los diferentes tipos de canales de calcio, se presentan en la figura 2.5.

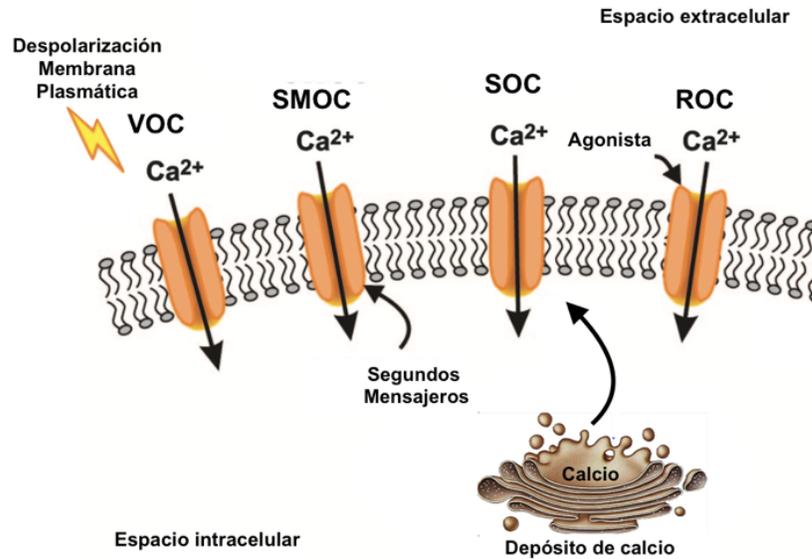


Figura 2.5: Mecanismos de activación canales de calcio. Expone los cuatro tipos de canales de calcio no activados por voltaje y sus mecanismos de activación. El retículo endoplasmático se presenta en color café. Modificado de [32].

En la imagen presentada anteriormente, se indica (analizando la figura de izquierda a derecha) que ante una despolarización de la membrana plasmática, los canales VOC se ven afectados, permitiendo el ingreso de calcio a la célula. Asimismo, se expone que ante la interacción de segundos mensajeros los canales tipo SMOC se activan. También, se indica que frente a la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, los canales SOC sufren una modificación la cual permite el ingreso de calcio. En el último segmento se presenta el mecanismo de activación de los canales ROC, donde la interacción de una molécula agonista del receptor con este permite el ingreso de calcio.

2.4. Proteínas transmembrana activadas por calcio

El ion calcio, además de participar en la contracción muscular, juega un rol primordial en la activación de proteínas transmembrana que actúan de manera no selectiva, y que transportan distintos iones desde y hacia el interior celular. Los canales que realizan esto son conocidos como canales CAN por sus siglas en inglés, *Calcium Activated Non-Selective Cation Channel*, y son de gran importancia en la regulación celular. Actualmente, existe una amplia investigación entorno a estas proteínas. Dentro de esta clasificación la familia de los canales iónicos TRP (por sus siglas en inglés, *Transient Receptor Potential Channels*) es uno de los más estudiados, ya que se encuentran localizadas en la membrana plasmática y poseen diversas funciones entre las que se destacan la mediación de procesos como: la visión, el tacto, la audición, y la detección de cambios de temperatura y sabores. [33]

2.4.1. Canales TRP

La superfamilia de canales TRP es la familia de canales cationicos con mayor diversidad de mecanismos de activación y selectividades que cualquier otro grupo de canales iónicos. Estos canales son permeables a distintos cationes, siendo principalmente permeables a calcio y magnesio (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Los canales pertenecientes a esta familia poseen una estructura común caracterizada por la presencia de seis dominios transmembrana donde la zona permeable a cationes esta situada entre el quinto y sexto dominio. Además, los extremos N y C- terminal corresponden a dominios intracelulares, creyéndose que los extremos amino y carboxil están encargados de la regulación del canal y la disposición de este. La estructura de los canales se presenta en la figura 2.6. [34]

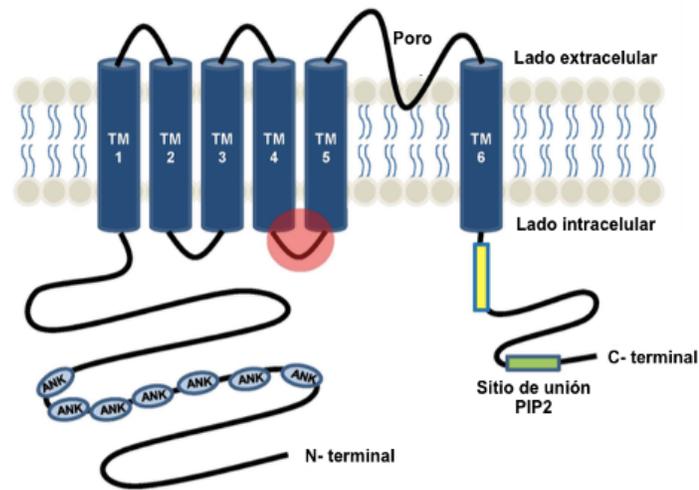


Figura 2.6: Estructura canales TRP.

La abreviatura TM representa a las proteínas transmembrana que conforman cada dominio. Además, se encuentra destacada en color rojo la zona aminoacídica que interactúa con lípidos endógenos o agentes farmacológicos. Entre los dominios TM5 y TM6 se encuentra el poro del canal. Modificado de [33].

Estos canales presentan un rol primordial en la detección por parte de las células de los cambios producidos en el ambiente y la interpretación de estos. Los canales TRP actúan como transductores de señales alterando el potencial de membrana o la concentración de calcio intracelular. En relación a esto último, la familia de canales TRP es capaz de contribuir a los cambios de calcio intracelular, añadiendo mecanismos de entrada del catión hacia la célula, modificando el potencial de membrana e incrementando la fuerza que permite la entrada de Ca^{2+} , o facilitando la liberación de este desde organelos intracelulares.

Dentro de los canales TRP existen 7 familias divididas según la homología estructural, clasificándose de la siguiente manera: TRPC (clásicos o canónicos), TRPV (vainilloides), TRPM (melastatina), TRPA (homólogos de la proteína ANKTM), TRPP (policistina),

TRPML (mucolipina) y TRPN (homólogos de la proteína NOMP-C). Estas familias no están completamente caracterizadas, pero han captado el interés de los científicos por su relación con múltiples enfermedades humanas. Las diferentes familias de canales TRP se presentan en la figura 2.7. [35]

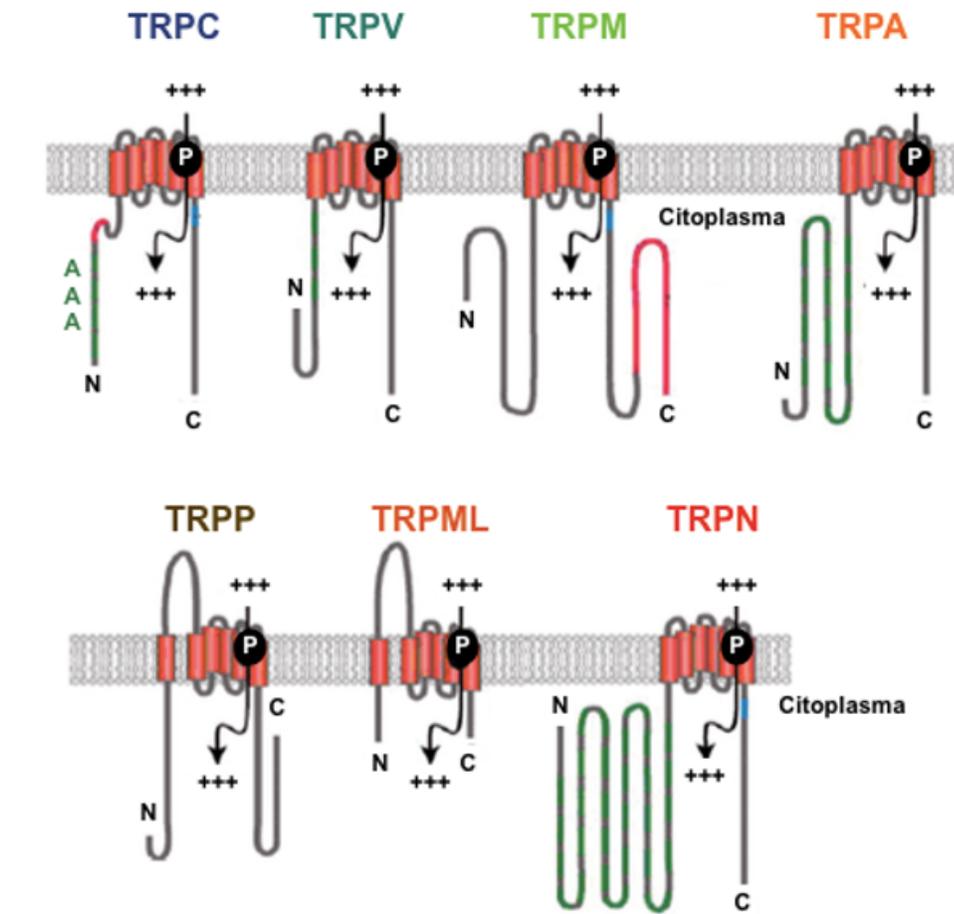


Figura 2.7: Familia de canales TRP.

Las repeticiones de anquirina, el poro del canal y los cationes están representadas por la letra A, P y por el símbolo (+++), respectivamente. Modificado de [34].

2.4.1.1. Canal TRPM4

Un subtipo de la familia TRPM corresponde a la proteína TRPM4 que transporta iones de Na^+ , K^+ , Cs^+ y Li^+ (en ese orden de afinidad) desde el espacio extracelular al citoplasma. La importancia de esta proteína en las células excitables, radica en su capacidad de transformar un cambio en la concentración de calcio en un cambio en el potencial de membrana. En la figura 2.8 el mecanismo de acción de este canal. [36][37][38]

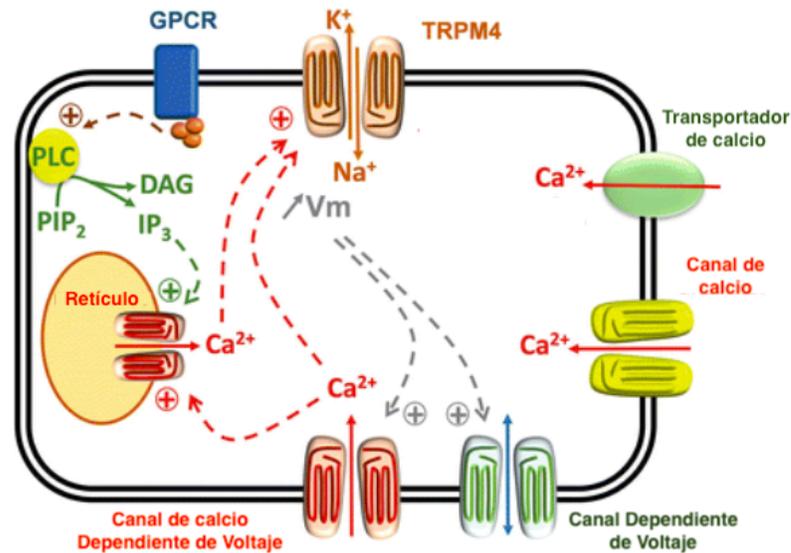


Figura 2.8: Efecto del canal TRPM4 sobre la concentración de calcio intracelular y cambio de potencial.

Se presenta el sistema en cascada que actúa desde la recepción de un agonista de los receptores asociados a proteínas G hasta la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Estos canales se indican en color verde y rojo; y el canal de TRPM4 se presenta en color café. Modificado de [39].

Concretamente, en la figura 2.8, se presenta que ante la apertura de los canales de calcio reticulares inducidos por la presencia de inositol trifosfato, las moléculas de calcio interactúan con el canal TRPM4, activándolo y permitiendo el ingreso de sodio al espacio citoplasmático. Si bien, la entrada de sodio no presenta un incremento en su concentración intracelular, si genera la despolarización de la membrana lo que incrementa el flujo de calcio por los canales dependientes de voltaje.

Acorde con las nuevas investigaciones se ha determinado que este canal a su vez posee efectos en la activación de la proteína FAK, ya que participa en el desarmado de los complejos proteicos. Así, al incrementar el porcentaje de canales TRPM4 activos, la fuerza generada ante la activación de los miofilamentos se transmite al resto del tejido del músculo liso. [40] Por otra parte, en un estudio realizado por (Kullmann et al., 2019) se ha demostrado que el aumento de la expresión de canales TRPM4 está relacionado con enfermedades del tracto urinario inferior tales como la incontinencia urinaria.[41] La expresión superficial del canal en la membrana plasmática está dado por el balance entre el tráfico anterógrado y retrógrado del canal. El tráfico anterógrado, corresponde al paso desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y la realización de posteriores modificaciones que permiten la maduración del canal. Por el contrario, el tráfico retrógrado corresponde al paso desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático, luego de la endocitosis de la proteína desde la membrana plasmática.

Asimismo, gracias a la investigación realizada por (Blanco et al., 2019) es posible concluir que las proteínas *End-Binding 1* (EB1), *End-Binding 2* (EB2), *End-Binding 3* (EB3) inter-

actúan con el canal TRPM4 y poseen un rol fundamental en la maduración de este. [42] Las tres proteínas EB están relacionadas con la regulación de la dinámica de los microtúbulos, el ciclo celular, la migración y diferenciación celular, además del tráfico de proteínas. Específicamente, estas proteínas se unen a los canales TRPM4 al reconocer una secuencia aminoacídica específica y altamente conservada denominada motivo SxIP. La secuencia característica de este motivo es: Serina-x-Isoleucina-Prolina, donde "x", puede ser cualquier aminoácido. El péptido con esta secuencia se une a las proteínas EB dimerizadas. Su ubicación en el canal se presenta con mayor detalle en la figura 2.9.

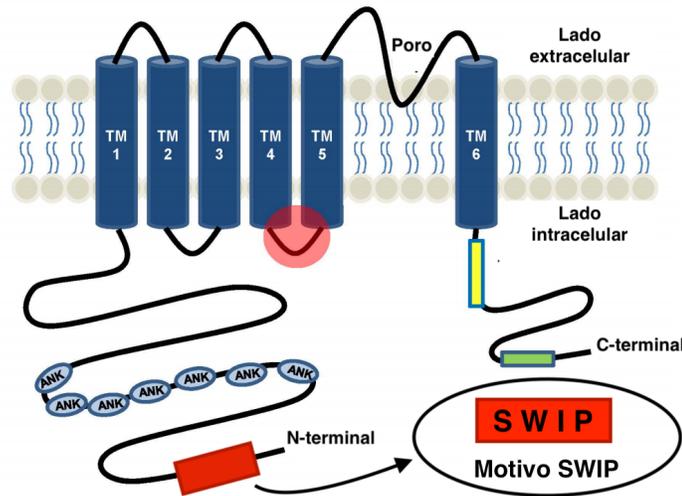


Figura 2.9: Motivo SWIP del canal TRPM4.

Se muestra la disposición espacial del canal TRPM4, sus dominios y el motivo de interacción con las proteínas EB. Se detalla la secuencia correspondiente a SxIP. Modificado de [33].

Dentro de la información proporcionada por la investigación de (Blanco et al., 2019), destaca el hallazgo asociado la función de las proteínas EB1 y EB2 en el tráfico y la actividad de los canales, y la expresión de estos en la superficie celular. Otro descubrimiento de esta publicación radica en identificar que las funciones mencionadas anteriormente, no se ven afectadas ante el silenciamiento de la proteína EB3, lo que podría indicar la baja interacción de esta proteína EB con el canal TRPM4. Estas propuestas nacen a partir del estudio de la interacción entre estas proteínas (EB1, EB2 y EB3) y las tres conformaciones distintas del canal TRPM4: motivo SWIP eliminado, motivo SWIP alterado en sus dos últimos aminoácidos y motivo normal. [42] En esta misma investigación, se afirma que frente la delección del motivo SWIP de los canales, la interacción con la proteína EB1 se ve suprimida y que ante la mutación del motivo en sus dos últimos aminoácidos (Δ SWIP), se elimina la interacción con las proteínas EB1 y EB3, pero no así con la proteína EB2. Asimismo, se señala la importancia del motivo en el transporte del canal desde el retículo endoplasmático (ER) al aparato de golgi, pero no se detalla el mecanismo de transporte del canal ni las proteínas EB relacionadas con cada etapa. El mecanismo de transporte se presenta en la figura 2.10, donde EB representa a las proteínas *End-Binding* que permiten el transporte de canal hacia la membrana.

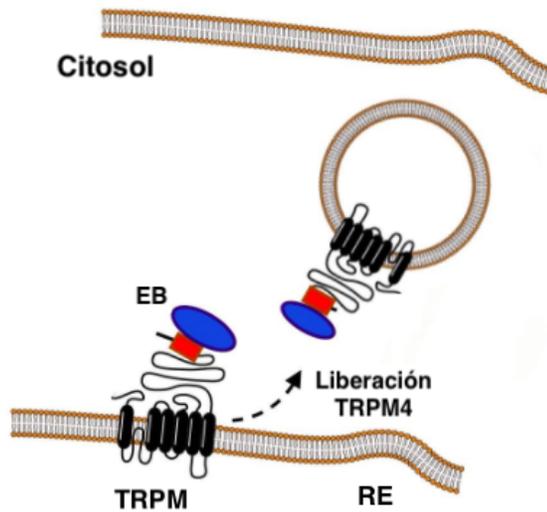


Figura 2.10: Transporte del canal TRPM4.

Representa el tráfico anterógrado del canal TRPM4, desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática. En color azul se presentan las diferentes proteínas EB. Modificado de [42].

Para determinar el mecanismo de transporte se pueden utilizar péptidos específicos que inhiben competitivamente la interacción entre el canal y las proteínas EB, ya que poseen una secuencia de unión al sitio SWIP. Estas macromoléculas están conformadas por la secuencia de penetración celular TAT (Twin-Arginine Translocation System), los primeros 21 aminoácidos del motivo de unión SWIP y el epítipo de hemaglutinina (HA) para facilitar su identificación. A partir de lo anterior, se pueden sintetizar tres péptidos, donde el primero posee la secuencia SWIP completa, el segundo corresponde al péptido con la secuencia SWNN (el cual denominaremos Δ SWIP en adelante) y el tercero es el péptido sin el motivo SWIP, es decir, sólo con la secuencia TAT y el epítipo de reconocimiento de hemaglutinina.

Específicamente, en esta investigación se sintetizará químicamente el péptido con el motivo SWIP mencionado anteriormente y se analizará su eficiencia como inhibidor de la maduración del canal TRPM4. Además, se estudiará su uso como potencial tratamiento farmacológico de la incontinencia urinaria. El mecanismo de acción del péptido SWIP se presenta en la siguiente figura 2.11.

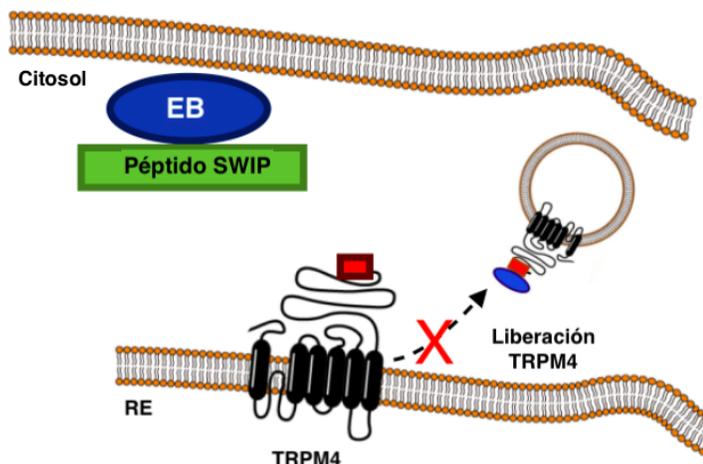


Figura 2.11: Mecanismo de acción péptido SWIP.

Se presenta el efecto esperado del péptido SWIP como tratamiento farmacológico para la incontinencia urinaria. El péptido SWIP se une al motivo SWIP de las proteínas EB inhibiendo la interacción entre estas y el canal, impidiendo así la maduración del canal. Modificado de [42].

De esta manera, se propone crear un nuevo fármaco que genere menos efectos secundarios que los producidos por la terapia farmacológica actual, basándose en tres principios fundamentales: el rol del canal TRPM4 en la contractilidad del músculo detrusor, la disminución de la contracción del detrusor al inhibir la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas *End-Binding*; y la alta expresión del canal TRPM4 en pacientes con incontinencia urinaria. Además, debido a que el sistema renal de un ser humano reabsorbe el 99 % del fluido, se espera que la concentración de péptido en la orina sea hasta 100 veces mayor que la plasmática, incrementando las posibilidades de emplear el péptido SWIP como tratamiento farmacológico.

Capítulo 3

Metodología

La presente investigación tiene como objetivo presentar un modelo de estudio de la aplicabilidad del péptido SWIP como inhibidor de la interacción entre las proteínas EB y el canal TRPM4, y su posible uso como supresor de la contracción del músculo detrusor de la vejiga. Además, se busca plantear una metodología para el correcto desarrollo farmacológico de la droga y su posterior aprobación por la FDA. Para ello se separa el estudio en una investigación cuantitativa y una cualitativa, cuyos procedimientos son explicados en los siguientes apartados. Particularmente, en la primera sección de la metodología se expone el procedimiento realizado para llevar a cabo el primer objetivo del trabajo que busca evaluar las características de penetración del péptido en la vejiga y las consecuencias morfológicas en el tejido vesical (ver sección 3.1). Para facilitar el entendimiento, y explicar el protocolo realizado se presentan los diagramas de flujo de cada etapa del procedimiento y se explican las acciones realizadas en cada fase.

Una vez explicitada la metodología realizada para responder el primer objetivo, se expone el procedimiento propuesto para determinar el efecto del péptido sobre la respuesta contráctil efectuada por la acetilcolina sobre el músculo detrusor, y el mecanismo de transporte y las proteínas EB involucradas en cada etapa del tráfico del canal TRPM4.

En las secciones 3.2, 3.3 se presentan las recomendaciones metodológicas propuestas. Los procedimientos indicados en este apartado fueron formulados en base a la estrategia llevada a cabo en otras investigaciones del mismo índole. Asimismo, en la sección 3.4 se presenta el procedimiento sugerido para desarrollar el estudio farmacológico del péptido. De este modo se establece la base para la futura investigación cuantitativa.

Finalmente, en el apartado 3.5 se explica el procedimiento realizado para diseñar el sistema de productivo del péptido en estudio, y el análisis de los costos asociados a su producción recombinante y a la compra directa de este en el mercado.

3.1. Penetración del péptido y consecuencias morfológicas

3.1.1. Inmunofluorescencia

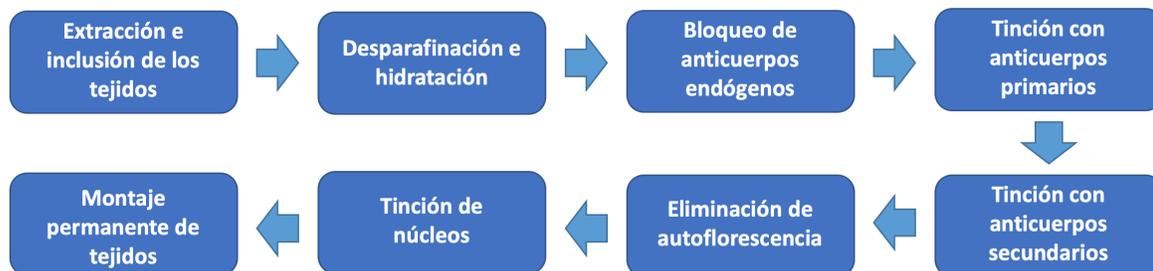


Figura 3.1: Metodología inmunofluorescencia.

Diagrama de la metodología realizada para llevar a cabo la inmunofluorescencia del tejido vesical para el estudio de la penetración y las consecuencias morfológicas del uso del péptido SWIP. Fuente propia.

Se emplearon tejidos de vejigas previamente fijados en formaldehído e incluidos en parafina, y seccionados según su disposición espacial. Para desparafinar e hidratar los tejidos estos fueron sumergidos en 3 soluciones distintas de xilol y en 5 soluciones de etanol. Con el fin de favorecer la desparafinación, se emplearon concentraciones descendientes de alcohol etílico (100 % - 70 % v/v) y cada placa se sumergió por 5 minutos en cada solución. Una vez hidratados los tejidos, se extrajo el etanol remanente limpiando con agua destilada y se suspendieron las placas en buffer Tris-EDTA [100 mM, pH 9, (e-5134, Sigma)] a 80°C por 30 minutos. Las placas fueron limpiadas empleando agua destilada. Además, se delimitó el área alrededor de los tejidos usando un lápiz hidrófobo. El bloqueo de los anticuerpos endógenos (o inmunoglobulinas endógenas, Ig) de ratón se realizó diluyendo Ig-G Anti-Mouse (H+L) hecho en cabra (1:500 v/v) en solución de bloqueo [FBS 10 % v/v (SV30160.03; GE Healthcare), DPBS 10 % v/v, Tritón X-100 1 % v/v (10789704001, MilliporeSigma)] por 1 hora a temperatura ambiente. Para favorecer la tinción homogénea de los anticuerpos se realizó la incubación en el rocket. La tinción con anticuerpos primarios (excepto el control) de Anti-TRPM4, Anti-actina de músculo liso (α -SMA) y Anti-hemaglutinina tag (HA) se realizó incubando los tejidos durante la noche a 4°C. Posteriormente se recuperó la solución de anticuerpos primarios y se lavaron los tejidos 3 veces con una solución de DPBS con Tritón X-100 (DPBS-Tritón X-100) al 1 % v/v. Una vez pasados los 15 minutos de lavado (5 minutos cada lavado), los anticuerpos secundarios fueron incubados durante 3 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron extraídos del tejido lavando con DPBS durante 5 minutos. Los anticuerpos empleados en este estudio se presentan a continuación en la tabla 3.1.

Luego se prepararon los tejidos incubándolos con el kit de eliminación de autofluorescencia por 5 minutos a temperatura ambiente. La solución remanente fue lavada usando DPBS.

Tabla 3.1: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la inmunofluorescencia del tejido vesical.

Anticuerpo	Isotipo	Dilución	Origen	N° catálogo
Rabbit anti-TRPM4	IgG (H+L)	1:100	Alomone	ACC-044
Mouse anti- α -SMA	IgG2a	1:200	Sigma Aldrich	A2547
Mouse Anti-HA	IgG2b	1:50	Roche	11 583 816 001
Goat F(ab) Anti-Mouse	IgG (H+L)	1:500	ABCAM	ab6668
Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG1	-	1:100	Thermo Fisher Scientific	A21240
Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse IgG2a	-	1:100	Thermo Fisher Scientific	A21137
Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG	-	1:100	Thermo Fisher Scientific	A11034

Posteriormente se adicionó DAPI (H1399, Thermo Fisher Scientific) a dilución de 1:5000 v/v durante 5 minutos y se lavó con DPBS. Finalmente, se montaron los tejidos adicionando 8 μ L de agente sellante (Prolong Gold Antifade Reagent, P36930, Thermo Fisher Scientific).

3.1.2. Tinción hematoxilina-eosina (HE)



Figura 3.2: Metodología tinción HE.

Diagrama de la metodología realizada para llevar a cabo la tinción con hematoxilina - eosina del tejido vesical para el estudio de la penetración y las consecuencias morfológicas del uso del péptido SWIP. Fuente propia.

Este método es uno de los más empleados en el diagnóstico médico, ya que permite teñir estructuras de manera diferenciada según la carga neta de estas. La hematoxilina es

un colorante catiónico afín a las estructuras negativas tales como el núcleo, mientras que la eosina es un colorante aniónico que permite teñir el citoplasma celular. Mediante esta técnica, se pueden diferenciar los núcleos, coloreados azul, del citoplasma teñido de color rosado.

Con el propósito de realizar la tinción de hematoxilina-eosina, se emplearon tejidos de vejigas previamente incluidos en parafina y seleccionados según su disposición espacial; luego de esta elección, se inició la desparafinación de las muestras. Para esto se sumergieron las muestras en 2 soluciones de xilol durante 10 minutos en cada una. Posteriormente se inició la rehidratación de los tejidos sumiéndolos en dos soluciones de alcohol etílico al 100 % v/v durante 5 minutos en cada una, una vez extraídos los tejidos estos fueron añadidos a soluciones de alcohol etílico a 95 % v/v y 70 % v/v por dos minutos para finalmente ser lavados en agua destilada. Luego se incubaron los tejidos en hematoxilina de Harris (hematoxilina 5 % m/v, etanol 100° 5 % v/v, alumbre de potasio 10 % m/v y óxido de mercurio 0,25 % m/v) durante 8 minutos y se extrajo el tinte remanente lavando con agua por 5 minutos. Para acentuar el contraste del colorante, se sumergieron los tejidos en alcohol-ácido (ácido clorhídrico disuelto en etanol al 1 % v/v) por 30 segundos. Después se lavaron los tejidos con agua por 5 minutos y posteriormente se sumergieron 10 veces en alcohol (95 % v/v). Con el fin de diferenciar los núcleos de los otros componentes de la célula, se sumergieron las muestras en una solución de eosina-floxina durante 1 minuto. Finalmente, se procedió a la deshidratación de los tejidos sumergiendo las muestras en dos soluciones de alcohol al 95 % v/v durante 2 minutos en cada una, y luego añadiéndolas en dos soluciones de xileno (5 minutos cada una). Las muestras fueron protegidas con un cubreobjetos y el agente sellante para evitar la contaminación y descomposición de los tejidos.

3.1.3. Análisis de resultados

3.1.3.1. Correlación TRPM4-HA

La detección de la relación existente entre el canal TRPM4 y el péptido SWIP, se realiza mediante el microscopio de laboratorio ApoTome de la empresa Zeiss Microscopy con un aumento digital de 30X. El estudio de las imágenes se produce de manera cualitativa empleando el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público, ImageJ, creado por el Instituto Nacional de Salud y de Instrumentación óptica y computacional para Laboratorio (National, Institute of Health, NIH). Asimismo, se utiliza el software de microscopio ZEN lite, que controla las cámaras de microscopio Axiocam, para mejorar la calidad de la imagen y optimizar el contraste entre los distintos canales (colores).

3.1.3.2. Densidad celular

Se seleccionó el área correspondiente al tejido muscular de las tinciones realizadas anteriormente y se cuantificó el área transformando la imagen de color a una imagen binaria. Después, se realizó el conteo de los núcleos de manera visual. Al igual que el análisis anterior, este se realiza empleando la herramienta ImageJ. Una vez obtenidos los valores, estos son normalizados, dividiendo el número de núcleos por el área analizada. De este modo se obtuvieron resultados más representativos que pueden ser comparados.

3.2. Estudio de contractibilidad muscular

El protocolo experimental planteado, CBA-1122 FMUCH, fue aprobado el 17 de abril del presente año por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) y tiene vigencia hasta abril del 2021 por lo que se debe llevar a cabo la siguiente metodología para estudiar la relajación y contracción muscular. Este protocolo, presentado en la sección G, fue creado a partir de los procedimientos realizados en publicaciones anteriores de la misma naturaleza. [43] [44] En la figura 3.3 se presenta el diagrama del procedimiento sugerido.

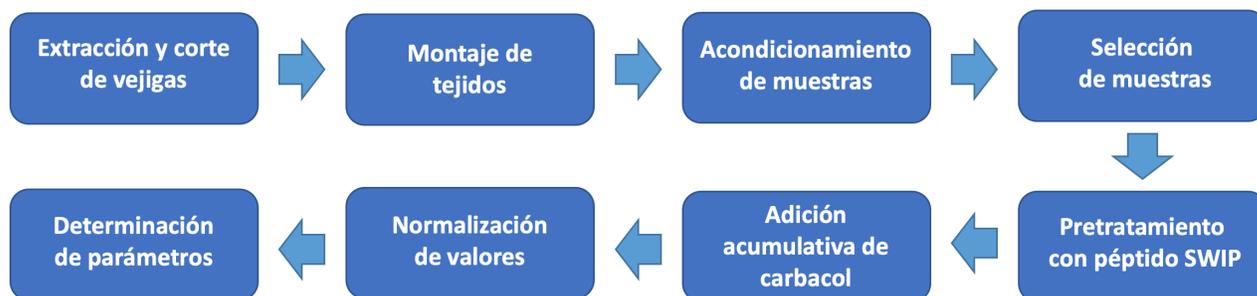


Figura 3.3: Metodología del estudio de contractilidad.

Diagrama de la metodología realizada para llevar a cabo el estudio de contractibilidad del tejido vesical. Fuente propia.

3.2.1. Pretratamiento

3.2.1.1. Cultivo organotípico

Una vez cortadas las vejigas en tiras de 2 x 8 mm estas deben ser montadas en una placa Petri cubierta de Sylgard a aproximadamente 3 mm de la superficie del Sylgard. Para lograr esto se emplearán alfileres de acero inoxidable de 0,2 mm. Las tiras montadas serán incubadas en 5 mL de medio libre de suero (DMEM/F-12 (1:1), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 250 ng/mL de anfotericina-B, 35 g/ml de ácido L-ascórbico, 5 g/mL de transferrina, 3,25 ng/mL de selenio, 2,85 g/mL de insulina y 200 g/mL de L-glutamina) por 48 horas a una temperatura constante de 37 ° C y en una atmósfera de 5%CO₂. Se debe cambiar el medio diariamente y estimular la contracción con 110 mM KCl-PSS (estéril) durante 5 minutos para luego lavar con PSS (estéril).

3.2.1.2. Medición de Tensión Isométrica

Posteriormente, las secciones de vejiga serán montadas en el baño termo-regulado con buffer Krebs-Henseleit (118,5 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 0,025 mM Na₄EDTA, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ y 5,6 mM glucosa). La temperatura y la concentración de potasio extracelular deben mantenerse constante a 37 °C y 5,9 mM, respectivamente. Para fijar el tejido, este debe unirse en un extremo al sensor de fuerza, y el otro borde debe sujetarse a la placa con una varilla de metal previamente esterilizada. Con el

objetivo de mantener el pH neutro, se deben gasear constantemente los tejidos con un flujo de oxígeno y dióxido de carbono al 95 % O₂ y 5 % CO₂. Posteriormente se debe aplicar fuerza al tejido para lograr que la tensión se mantenga constante a 1 G (~10 mN). Esto debe realizarse mientras se lavan los tejidos adicionando buffer a 37°C. Luego se debe acondicionar el tejido entre 1-2 horas o hasta que la tensión se mantenga constante, realizando los lavados cada 15 minutos. Una vez adaptados los tejidos, se deben seleccionar las muestras viables añadiendo KCl directamente al baño (80 mM), y desechando aquellos que muestren con tensión menor a 20 mN. Antes de iniciar el tratamiento con el agonista se deben lavar los tejidos seleccionados entre 3 a 5 veces adicionando buffer al baño. Para iniciar el estudio de contractibilidad, los tejidos deben ser pre-tratados con péptido SWIP a distintas concentraciones (5 nM, 50 nM, 250 nM y 500 nM) durante 24 horas. La tensión debe ser ajustada nuevamente en cada cambio de buffer hasta obtener una fuerza de 10 mN. Una vez finalizadas las 24 horas de pre-tratamiento se extrae el péptido remanente lavando con buffer fresco sin agonista durante 5 minutos. Repitiéndose 3 veces.

3.2.2. Curva de dosis respuesta

Una vez finalizados los lavados se generan las curvas de concentración-tensión añadiendo carbacol al baño de manera acumulativa (10 μ M - 10 mM). Se debe repetir este procedimiento para cada concentración de péptido estudiada (5 nM, 50 nM, 250 nM y 500 nM).

Para trabajar con una muestra representativa, se deben repetir los experimentos con 5 tejidos distintos para cada concentración de péptido analizada. De esta manera se asegura un estudio estadísticamente significativo.

3.2.3. Análisis de datos

Al finalizar los experimentos, y con el fin de analizar la información correspondiente a cada condición experimental, se deben estudiar las curvas de manera separada y seleccionar los datos obtenidos entre 30-10 segundos antes del peak de la respuesta inducida. Una vez seleccionados los valores, se debe medir la amplitud de la curva de tensión y normalizar el valor, dividiéndolo por la máxima respuesta contráctil obtenida al incubar los péptidos con KCl (80 mM).

3.2.4. Cálculo EC₅₀

Una vez seleccionada la concentración óptima de péptido, se procede a estudiar la cinética del fármaco analizando la variación del parámetro EC₅₀ para distintos tiempos de incubación (6, 12, 24 y 48 horas) con la concentración de péptido SWIP óptima. Al graficar estos valores se puede determinar la variación de la concentración de péptido que genera la mitad de la respuesta contráctil en función del tiempo.

3.3. Tráfico del canal TRPM4

Para realizar este procedimiento se deben realizar las etapas indicadas en el siguiente diagrama. El detalle de cada fase se encuentra en las siguientes secciones: 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4.

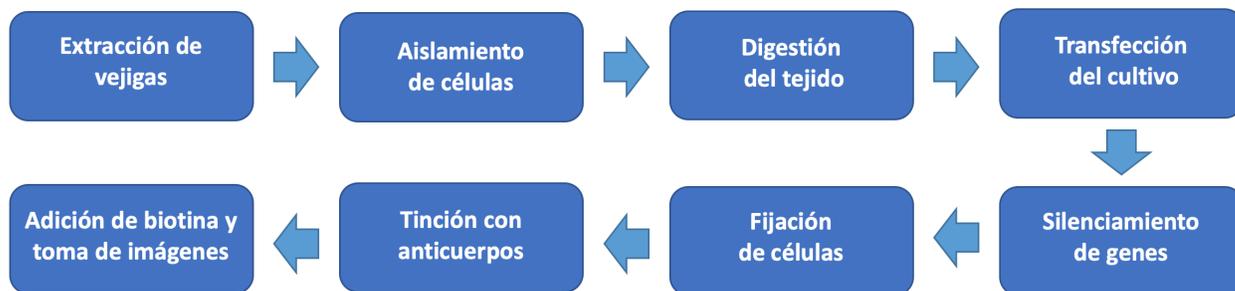


Figura 3.4: Metodología propuesta tráfico canal TPRM4.
 Diagrama de la metodología propuesta para llevar a cabo el estudio del tráfico del canal iónico. Fuente propia.

3.3.1. Preparación del cultivo primario

Se deben extraer las vejigas de animales sin manipulación previa, luego estas deben ser tratadas para aislar las células del músculo detrusor y preparar el cultivo primario, evitando que se mantengan más de 2 horas en hielo. La separación del tejido muscular comienza con la disección de la mucosa del tejido muscular, empleando un bisturí y raspando suavemente la superficie para evitar dañar la muestra. Al apartar el detrusor este debe ser cortado en trozos y sumergido por 30 minutos en la solución de digestión (0,25 % Tripsina-EDTA y 0,15 % colagenasa) a 37°C. Al finalizar la digestión, el músculo debe ser triturado y filtrado en un tamiz celular estéril de tamaño de poro de 100 μm . Posteriormente, se debe medir el volumen de permeado obtenido y adicionar el mismo volumen de medio RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) con 10 % de FBS, para inactivar la tripsina remanente. Es necesario separar las células musculares, centrifugando la solución por 10 minutos a 1600g, para luego ser resuspendidas en RPMI con 10 % de FBS, antibiótico y antimicótico, además de factor de crecimiento a una concentración de 25 ng/mL. A continuación se deben distribuir aproximadamente 10^6 células en cada pocillo de la placa de 48 pocillos para luego ser incubadas a 37°C y mantenidas en una atmósfera de oxígeno y dióxido de carbono al 95 % O_2 y 5 % CO_2 hasta la producción de una monocapa celular. [45]

3.3.2. Construcción sistema RUSH

El sistema RUSH (Retention Using Selective Hooks) se basa en la interacción reversible de la proteína gancho (*hook*) y el biosensor. El gancho corresponde a una proteína que usualmente se encuentra en el organelo en cuestión unida a una molécula de estreptavidina. Dependiendo de la proteína que se emplee, el gancho puede ser almacenado en cualquier compartimiento celular, tales como el aparato de golgi y el retículo endoplasmático. Por otro lado, el biosensor corresponde a la molécula de estudio unida a una proteína fluorescente verde (GFP) y un motivo de unión a estreptavidina (Streptavidin Binding Peptide, SBP). De esta forma, el motivo SBP interactúa con la estreptavidina, lo que mantiene al biosensor unido al gancho. Para debilitar esta interacción, se adiciona biotina, ya que esta se une con gran afinidad a la estreptavidina compitiendo con el SBP, lo que permite el tráfico anterógrado de la proteína de interés. Cabe mencionar que al unir la proteína de interés con GFP, se puede

observar por microscopia la presencia y la distribución subcelular del biosensor a diferentes tiempos. Debido a lo anterior se propone emplear este sistema para analizar el tráfico del canal TRPM4.

Una vez preparado el cultivo primario, se inicia la transfección de las células con Str-Li-BFP-KDEL, mIFP-Golgi-7 y SBP-EGFP-TRPM4, donde el primer plasmidio contiene los genes que codifican para estreptavidina con el motivo KDEL (plasmidio 65266, Addgene) lo que genera una nueva línea celular que expresa el gancho (hook) del retículo endoplasmático y que marca este organelo de color azul. El segundo plasmidio, permite marcar el aparato de golgi con la proteína fluorescentes mIFP (plasmidio 56221, Addgene). Finalmente, el tercer plasmidio posee los genes que codifican para el canal iónico en estudio y para el sitio unión a estreptavidina, además de la proteína fluorescente verde. De forma paralela, se deben silenciar los genes de síntesis de las proteínas EB1, EB2 y EB3 añadiendo los shRNA respectivos (TL316980, TF311571 y TF311570, Origene). Las células deben seleccionarse mediante inmunofluorescencia. [46][47]

3.3.3. Detección del tráfico del canal TRPM4

Una vez detectadas las colonias recombinantes estas deben ser sembradas en placas de poliestireno de 384 pocillos negras y para asegurar el silenciamiento correcto de las proteínas EB, deben ser incubadas por 72 horas antes de iniciar el tratamiento con biotina. Para liberar el biosensor se añade al cultivo biotina ($40\mu\text{M}$) y se emplean como control negativo aquellas células con shRNA scramble. Una vez añadida la biotina se inicia la grabación del tráfico del canal TRPM4 desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática mediante el registro de lo detectado por el microscopio. El proceso se debe realizar a temperatura constante (37°C).

3.3.4. Análisis del tráfico del canal

Una vez terminado el procedimiento, se propone analizar el vídeo separando las imágenes y calcular la distancia entre el canal y el retículo endoplasmático, y la distancia entre el canal y el aparato de golgi por medio del código MATLAB creado para este fin. Este código se presenta en la sección A. Esta herramienta también se puede emplear para calcular la velocidad del tráfico del canal, ya que se tendrá conocimiento del tiempo transcurrido y la distancia recorrida. De esta forma se propone un mecanismo para determinar la velocidad de tráfico desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de golgi, y desde el aparato de golgi a la membrana plasmática para las cuatro condiciones a estudiar (shRNA EB1, shRNA EB2, shRNA EB3 y shRNA scramble). Además, se plantea utilizar la herramienta Matcol de Matlab para cuantificar la colocalización entre el canal TRPM4 y el retículo endoplasmático o el aparato de golgi, ya que como se menciona anteriormente, se emplean marcadores fluorescentes para destacar estos organelos. [48]

3.4. Etapas del desarrollo farmacológico

Para proponer un sistema de desarrollo farmacológico del péptido SWIP que permitiese la aprobación del uso de este como terapia farmacológica en pacientes con incontinencia urinaria, se realiza una investigación bibliográfica en la que se analizan las etapas definidas y los documentos solicitados por la FDA para este fin. También, se realiza una investigación bibliográfica en torno a los estudios realizados por otros investigadores que permitieron la aprobación por parte de la FDA del fármaco que estudiaban y su posterior comercialización como tratamiento farmacológico.

3.5. Diseño Productivo y análisis de costos

3.5.1. Sistema de producción

Para proponer el diseño productivo preliminar del péptido lo primero que se hizo fue investigar sobre las principales técnicas de síntesis industrial de proteínas farmacéuticas, y luego de realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica. En base a la estructura del péptido SWIP y los costos asociados a la producción, se escogió la síntesis recombinante por sobre la síntesis química, ya que esta última no es rentable a gran escala. Una vez seleccionado el sistema de producción se determinó el organismo huésped. Para ello se escogieron los principales organismos empleados en la industria y se seleccionó aquel que cumpliera con las características requeridas por el sistema. Dentro de las observaciones realizadas, se encuentra la búsqueda de un organismo cuyo genoma sea conocido, que tenga la capacidad de producir la proteína correctamente plegada y que posea una alta tasa de producción.

Para escoger el mecanismo de filtración de los microorganismos se analizaron diversos sistemas, escogiendo el más empleado en la industria y con menor costo económico. De esta forma se determina realizar la filtración mediante una membrana de fibra hueca posicionada a la salida del reactor, que permita concentrar la biomasa y reingresar parte del permeado al reactor. Luego de separar la biomasa, esta debe ser triturada para facilitar la extracción de los cuerpos de inclusión. Para determinar el mecanismo de lisis se investigaron los principales mecanismos de ruptura celular empleados en la industria y se seleccionó aquel con menor costo y mayor eficiencia.

Por otro lado, para determinar el mecanismo de separación de los cuerpos de inclusión del resto de contaminantes, se determinó teóricamente el tamaño promedio de estos cúmulos y se definió el tamaño de poro de la membrana. Asimismo, se seleccionó el material más empleado a nivel industrial para la producción de péptidos. Luego de determinar el mecanismo de filtración de los cuerpos de inclusión, se analizó el sistema de plegamiento más simple y económico empleado en la industria farmacéutica y se seleccionó la columna de cromatografía a emplear para obtener un alto porcentaje de pureza.

Finalmente, para determinar el mecanismo de almacenaje se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las principales técnicas usadas a nivel industrial para almacenar los productos farmacéuticos y se escogió aquel con mayor eficiencia y durabilidad. Con respecto al mecanismo de administración, se investigaron las principales dificultades asociadas a la adminis-

tración oral e intradérmica, determinando que esta última es aquella con mayores ventajas y un menor número de dificultades. Con el objetivo mencionado anteriormente, se investigaron los últimos avances en la industria biofarmacéutica y se escogieron aquellos sistemas que aseguren un mayor rendimiento, menor costo económico y menor número de operaciones unitarias.

3.5.2. Cálculo de costos asociados

Para determinar la masa de péptido a producir, se calcula la masa necesaria para el ensayo de tensión y el estudio de seguridad a realizarse en la fase preclínica del desarrollo del fármaco. La estimación de la cantidad de tejidos a estudiar en el ensayo de tensión se realizó mediante las ecuaciones B.1 y B.2, donde la primera indica el tamaño de la muestra sin considerar pérdidas por manejo inadecuado de los tejidos y la segunda fórmula permite calcular el tamaño de la muestra real considerando la posibilidad de daño. Los datos empleados para el cálculo, tales como la desviación estándar y la contractilidad máxima de la muestra, fueron extraídos de dos estudios donde se emplea un conocido inhibidor selectivo del canal TRPM4 (9-fenantrol) y se evalúa la tensión para distintas concentraciones del inhibidor ante la adición acumulativa de carbacol. Específicamente, para la determinación del tamaño de la muestra se emplea una contractilidad del control y de la muestra de 100 % y 80 %, respectivamente. Asimismo, se emplea una desviación estándar del 20 % para el control y la muestra. Además, se fija la significancia en 5 % y el poder de estudio en 80 %. Con respecto al cálculo del tamaño real de muestra, se considera el daño del 20 % de las materias primas, ya que se espera que la preparación de tejidos sea realizado por expertos en el área, por lo que el valor utilizado está sobreestimado.

Para el cálculo de la masa de péptido a necesario para el ensayo de tensión se utilizó la ecuación C.3, donde se indica que la masa total para este análisis corresponde a la suma de las masas necesarias para cada pretratamiento. En relación al estudio de seguridad a realizarse en modelo animal, se propone que este será realizado en ratas cuyo peso promedio es de 25 gramos, y que el fármaco será administrado por medio de una bomba osmótica implantado en lomo del animal. Particularmente, se emplea la información correspondiente a la bomba osmótica Alzet modelo 2002, ya que el equipo investigador desea realizar el estudio de seguridad administrando el fármaco de manera continua por tres semanas. Además, este sistema es de fácil manejo, posee una baja tasa de infección y evita el estrés constante en el animal. En este análisis se indica que se estudiara la evolución de 56 animales, ya que se evaluarán 3 concentraciones distintas del péptido SWIP, además de usar un control negativo. El estudio del péptido SWIP se realizará en duplicado y para que el estudio sea estadísticamente significativo se emplearán 8 animales por grupo. Luego de determinar la masa de péptido requerido, se calcula el volumen de cultivo recombinante que asegura la producción deseada empleando la ecuación D, y asumiendo un rendimiento de 0,65 mg de proteína recombinante por litro de cultivo. Este valor fue extraído de una investigación similar, en la cual se emplea el mismo organismo de producción y sistema de purificación.

Finalmente, el costo de producción recombinante de péptido para el estudio preclínico es determinado a partir del gasto asociado a la compra del equipamiento. Asimismo, y a modo de comparación, se realizaron dos cotizaciones del valor correspondiente a la compra directa

del péptido a dos empresas expertas en el rubro. Los precios cotizados para los equipos y la compra del inhibidor se presentan en las secciones E y F, respectivamente.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Penetración del péptido y efectos en morfología vesical

Para determinar la capacidad de penetración del péptido en el tejido vesical se analizan vejigas de ratones que han sido tratados previamente con dosis constantes de péptido. Para esto, se insertaron bombas osmóticas en los ratones, las cuales tenían una tasa de liberación de $0,25 \mu\text{l/h}$. En este estudio se analizó el comportamiento de tres grupos: ratones tratados con péptido SWIP, ratones tratados con péptido ΔSWIP y ratones sin tratamiento farmacéutico (grupo control negativo).

Al examinar los hallazgos morfológicos producto de la exposición al péptido en la vejiga, se observa primeramente, la presencia del péptido a lo largo de todo el tejido vesical, encontrando señal HA (péptido) positiva tanto en la porción epitelial como en la muscular para las condiciones SWIP y ΔSWIP , ambas señales con un patrón de expresión citoplasmática y a nivel de membrana plasmática. Esto se puede evidenciar en la figura 4.1 presentada a continuación, ya que si se selecciona el área correspondiente al músculo (zona marcada de color rojos en la segunda columna) y se sobrepone en la imagen que representa la señal del péptido (tercera columna) se observa la clara colocación de las señales tanto para la muestra tratada con péptido SWIP, como para la tratada con ΔSWIP . Así mismo, si se selecciona el área sin señal de $\alpha\text{-SMA}$ (segunda columna), correspondiente al tejido epitelial, y se sobrepone en la imagen con la señal de HA (tercera columna), igualmente se observa que la presencia de péptido en este tejido.

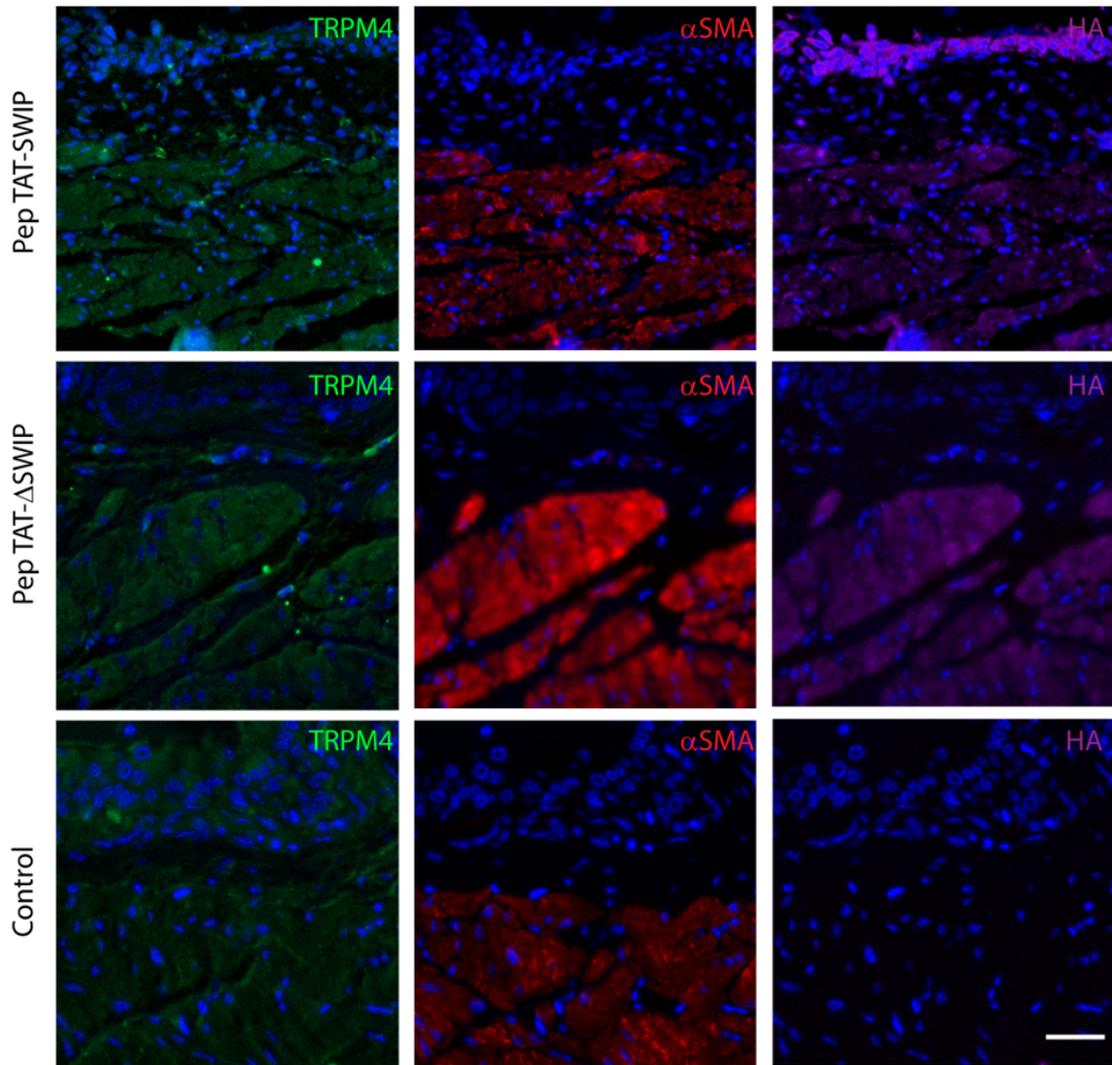


Figura 4.1: Inmunofluorescencia del tejido vesical.

Se presenta la inmunología de los tejidos de vejiga frente al uso del péptido SWIP, Δ SWIP y control negativo. la primera columna representa el marcaje específico para el canal TRPM4, la segunda (en color rojo) representa la tinción de las fibras musculares y la tercera columna (color lila) representa el el marcaje específico del péptido SWIP y Δ SWIP. La barra posicionada en la figura representa una distancia de 50 μ m. Se emplea el microscopio con el lente objetivo de 30X.

Durante el estudio de las consecuencias morfológicas de la exposición al péptido en animales tratados con placebo, péptido Δ SWIP o péptido SWIP se analizó el número de núcleos por milímetro cuadrado de cuatro tejidos musculares para cada condición, determinando que todas las muestras pertenecientes a animales tratados con péptido SWIP, poseen un menor número de núcleos por unidad de área (ver tabla 4.3), lo indica el incremento del tamaño de las fibras musculares asociado probablemente a hiperplasia epitelial.

Tabla 4.1: Datos obtenidos experimentalmente para los tejidos de animales tratados sin péptido (control negativo).

Muestra	Núcleos [unidad]	Área [mm ²]	Razón [núcleos/mm ²]
1	251	0,886	283
2	364	1,166	312
3	331	1,077	331
4	316	1,003	316

Tabla 4.2: Datos obtenidos experimentalmente para los tejidos de animales tratados con péptido Δ SWIP.

Muestra	Núcleos [unidad]	Área [mm ²]	Razón [núcleos/mm ²]
1	244	1,632	150
2	401	1,547	260
3	253	0,945	268
4	247	0,611	404

Tabla 4.3: Datos obtenidos experimentalmente para los tejidos de animales tratados con péptido SWIP.

Muestra	Núcleos [unidad]	Área [mm ²]	Razón [núcleos/mm ²]
1	177	1,165	152
2	259	1,325	195
3	136	0,780	174
4	15	0,195	195

Al promediar los valores obtenidos de la cuantificación del efecto del péptido en el músculo detrusor mediante el cálculo de la relación entre número de núcleos por área de músculo, se obtienen los siguientes resultados para cada grupo de estudio.

Tabla 4.4: Datos obtenidos para el análisis morfológico de los tejidos vesicales.

Tratamiento	Razón [núcleos/mm ²]	Desviación estándar [núcleos/mm ²]
Control	305	14,5
Δ SWIP	270	10,4
SWIP	179	20,4

Los resultados presentados anteriormente indican que el tejido control presenta una densidad celular mayor que los tejidos de animales tratados con péptido SWIP, siendo estas de 305 células/mm² y 179 células/mm², respectivamente. Asimismo, se presenta una menor densidad celular en aquellas vejigas de ratones tratados con el péptido Δ SWIP, siendo la densidad celular promedio de este grupo de 270 células/mm². La diferencia de densidad celular para cada condición se puede observar en la figura 4.2, donde se muestra que las fibras musculares para los tejidos tratados con péptido SWIP y Δ SWIP son más gruesas y menos densas que las fibras del control a pesar de estar sometidos al mismo aumento (lente objetivo de 20X). Debido a lo anterior, es posible afirmar que el péptido SWIP produce cambios a nivel muscular los cuales están asociados posiblemente a la hipertrofia celular. Se postula que este efecto celular podría surgir como mecanismo compensatorio del tejido vesical frente a la disminución de la contractilidad del detrusor.

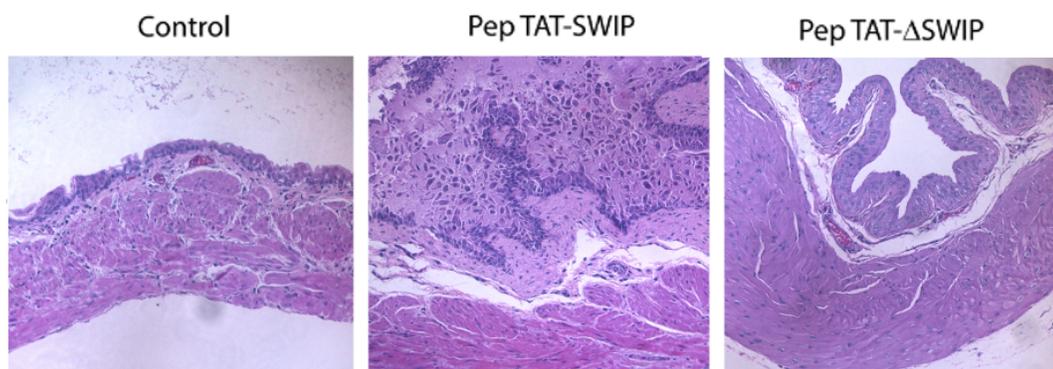


Figura 4.2: Histología del tejido vesical.

Se presenta la histología de los tejidos de vejiga frente al uso del péptido SWIP, Δ SWIP y control negativo.

Cabe destacar que la relación mencionada en el párrafo anterior corresponde a una relación semi-cuantitativa, ya que se realiza a partir del estudio visual de tejidos, por lo que es

necesario automatizar el mecanismo de conteo de núcleos y determinación del área muscular, mediante herramientas computacionales preexistentes, tales como interfases de Python, Matlab, entre otras, para disminuir los errores aleatorios. Además, se propone calcular el número de muestras requeridas por cada grupo de estudio, para asegurar que el análisis sea estadísticamente significativo.

4.2. Curva dosis-respuesta

El primer análisis propuesto corresponde a la creación de la curva de tensión producida por el tejido muscular ante el incremento acumulativo de carbacol, un agonista de los receptores de acetilcolina con mayor vida media que la acetilcolina. Se plantea observar la tensión ejercida por el sistema ante la adición de carbacol en tejidos incubados previamente con diferentes concentraciones del péptido SWIP. Para ello se examina el comportamiento de los tejidos para cuatro concentraciones diferentes de péptido SWIP y un control negativo.

Dentro de los resultados esperados, se cree que a medida que se incrementa la concentración de péptido empleada durante el pretratamiento, las curvas características de cada tejido se irán desplazando hacia la derecha, en comparación a la curva control, y que la magnitud de la tensión máxima generada irá disminuyendo conforme incrementamos la concentración de fármaco, siendo estos siempre menor a la tensión máxima obtenida en el análisis del tejido control. Lo descrito anteriormente se presenta en la figura 4.3, donde se indica que para una concentración arbitraria de péptido SWIP, la curva se verá desplazada hacia la derecha en comparación de la curva control.

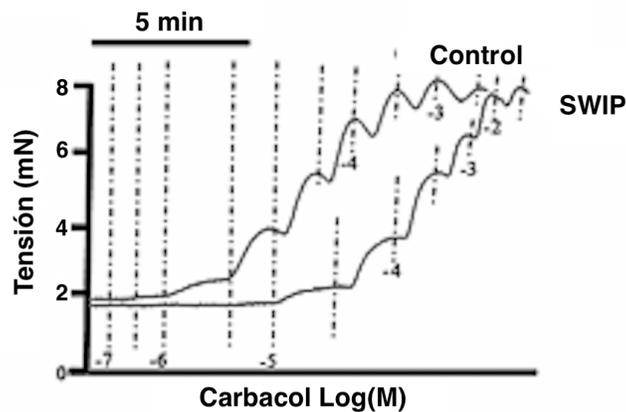


Figura 4.3: Resultados esperados para la tensión vesical. Representa la gráfica esperada de la tensión producida frente a al incremento en la concentración de carbacol por la adición acumulativa de este. Modificado de [49].

Como se menciona anteriormente, se espera que al incrementar la concentración de péptido añadido al tejido, la curva se desplace a la derecha debido a la presencia de una menor cantidad de canales TRPM4 maduros en la membrana plasmática, ya que la unión entre

el péptido y las proteínas EB durante el pretratamiento, disminuye la velocidad del tráfico anterógrado del canal, y por ende la concentración de canales activos en la membrana plasmática. La representación gráfica esto se expone en la figura 4.4, donde la concentración de péptido sigue un orden ascendente, siendo este el siguiente: $C1 < C2 < C3$.

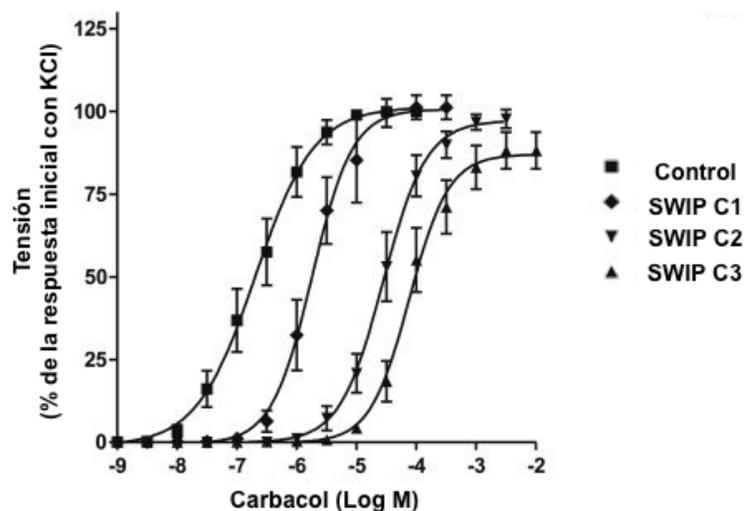


Figura 4.4: Resultados esperados curva dosis respuesta. Representa la gráfica esperada de la tensión producida frente a un incremento en la concentración de carbacol para distintas concentraciones de SWIP. Modificado de [49].

Cabe destacar que los resultados esperados mencionados anteriormente se condicen con la información publicada por distintos investigadores sobre las curvas de dosis-respuesta para los fármacos anticolinérgicos empleados en el tratamiento de la incontinencia urinaria.

En la imagen 4.5 se presentan las curvas características de la darifenacina, oxibutinina, soliferacina y tropio. En estas figuras se muestra un claro desplazamiento de las curvas hacia la derecha a medida que se incrementa la concentración de fármaco utilizado en el periodo de incubación, lo que concuerda con lo mencionado anteriormente. Asimismo, es posible detectar que a altas concentraciones de carbacol, los fármacos presentan un comportamiento diferente, por ejemplo, al emplear darifenacina para el estudio de contractilidad, la tensión máxima obtenida disminuye al incrementar la concentración de fármaco, sin embargo esto no ocurre al tratar los tejidos con tropio lo que indica que si bien ambos fármacos actúan sobre los receptores muscarínicos, tienen afinidades diferentes por los tres tipos de receptores presentes en el detrusor. A pesar de lo anterior, todos los medicamentos mantienen un comportamiento similar, ya que las curvas se desplazan hacia la derecha al incrementar la concentración de fármaco, y muestran un bajo efecto inhibitorio a altas concentraciones de carbacol, lo que indica que su mecanismo de acción se basa en la competencia con la acetilcolina por el sitio de unión del receptor muscarínico.

Como el péptido SWIP trabaja inhibiendo la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas EB, debido a su unión al motivo de interacción de las proteínas EB, el mecanismo de acción es diferente al de los fármacos empleados actualmente. Específicamente, se basa en

la inhibición de la maduración del canal TRPM4 y la disminución paulatina del transporte anterógrado; debido a esto, se espera que la curva característica del péptido SWIP tenga un comportamiento distinto al de los fármacos mostrados en la imagen 4.5 ante altas concentraciones de carbacol. Concretamente, se espera que el fármaco mantenga su potencial de acción frente a altas concentraciones de neurotransmisor, ya que este afecta directamente al número de canales presentes en la membrana y no compete por el sitio alostérico con el neurotransmisor.

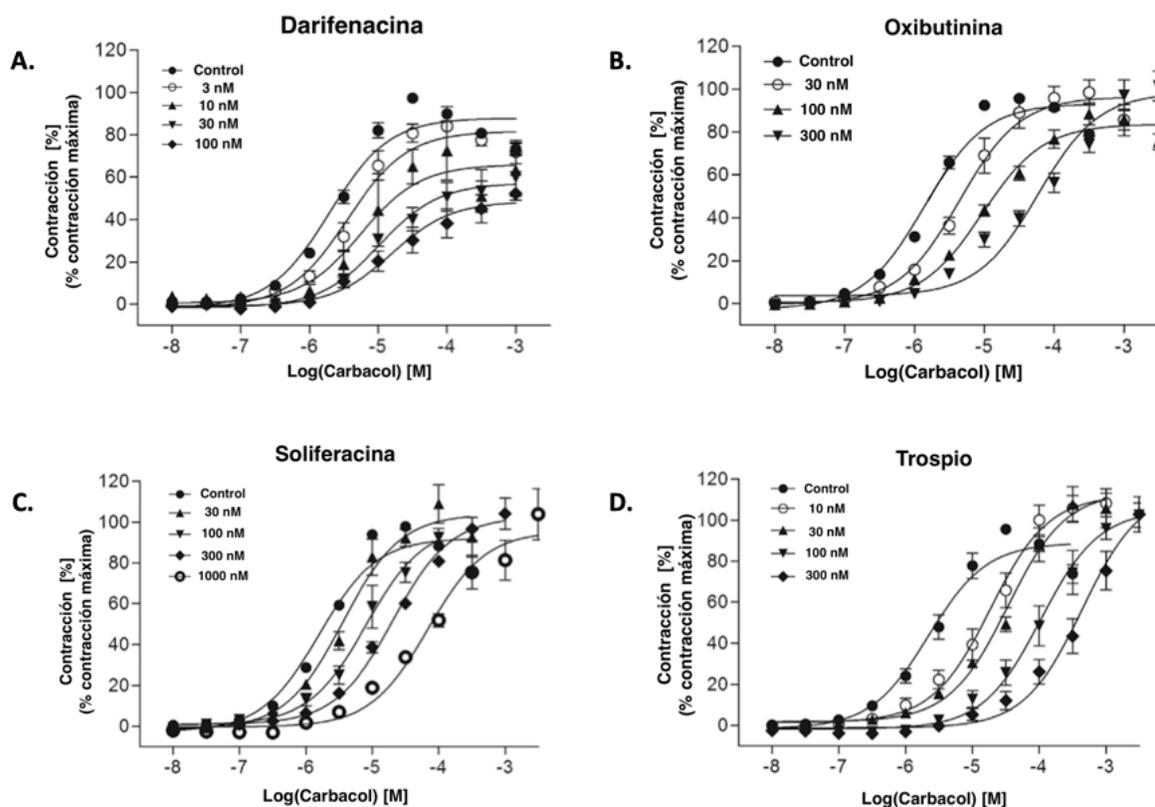


Figura 4.5: Curvas de dosis-respuesta para distintos fármacos.

Expone las curvas características de los principales fármacos empleados para en el tratamiento de la incontinencia urinaria de urgencia. Modificado de [50].

4.3. Determinación EC_{50}

Una vez determinadas las curvas de dosis-respuesta para cada concentración de péptido SWIP, y al graficarlas de manera conjunta se espera obtener un esquema similar al presentado en la figura 4.6.A. En esta imagen se observa que al incrementar la concentración de péptido SWIP en la solución de pretratamiento, las curvas de respuesta se desplazan hacia la derecha. Esto se debe a que, durante la incubación con péptido SWIP, esta molécula interactúa con el motivo de unión SWIP de las proteínas EB formando el complejo EB-SWIP. Teniendo en

cuenta que la cantidad de proteínas EB es mucho mayor que las moléculas de péptido SWIP y asumiendo una cinética de primer orden, se espera que se produzcan tantos complejos EB-SWIP como moléculas de péptido sean capaces de llegar al citoplasma celular y asociarse al motivo SWIP. Este es el mecanismo por el cual el péptido disminuye la cantidad de proteínas EB disponibles para el tráfico del canal y por ende se reduce el número de canales TRPM4 maduros en la membrana plasmática. Al existir un menor número de canales TRPM4 en la membrana, se genera una menor despolarización de esta, lo que disminuye el efecto activador sobre los canales de calcio dependientes de voltaje; esto a su vez actúa disminuyendo la contracción muscular del detrusor producida ante la adición acumulativa de carbacol.

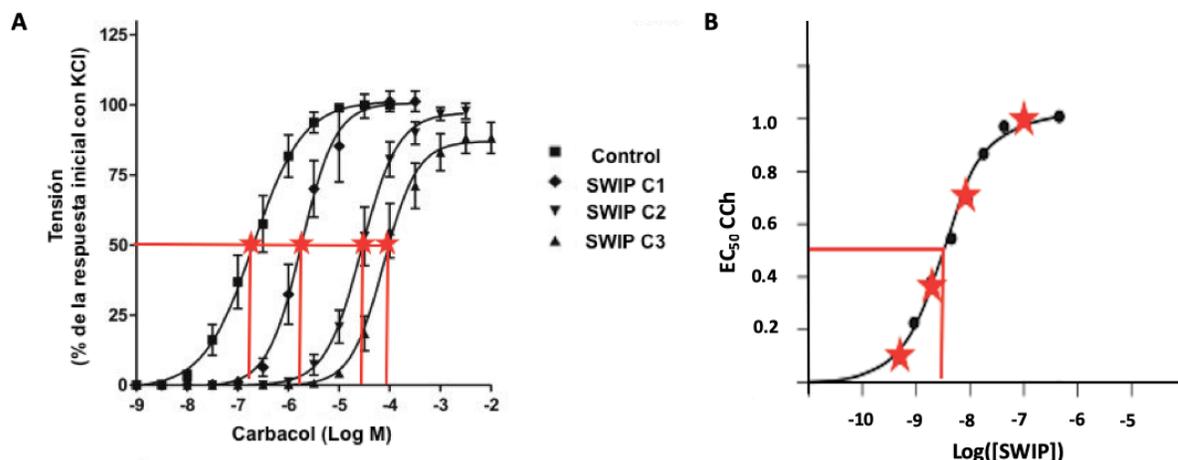


Figura 4.6: Curva EC_{50} para péptido SWIP.

La sección (A) representa las curvas de tensión para diferentes concentraciones de péptido y el mecanismo de obtención de EC_{50} . La sección (B) indica la curva esperada para el valor del EC_{50} en función del logaritmo de la concentración de fármaco. Modificado de [49].

Al determinar la concentración de péptido que genera la mitad de la inhibición para cada una de las concentraciones del péptido y graficar estos valores en función de la concentración de péptido SWIP, se espera obtener una curva similar a la presentada en la figura 4.6.B. A partir de esta curva se sugiere obtener el rango de concentración de péptido que genera la mitad de la contracción muscular y que presente una mayor eficiencia por unidad de masa de péptido. Cabe destacar que la curva está hecha para el logaritmo de la concentración de SWIP, por lo que los trazos superior e inferior de esta, son segmentos ineficientes que requieren un gran cambio en la concentración de fármaco para observar cambios mínimos en la contractilidad muscular.

Si bien no es posible obtener el rango de concentraciones de péptido SWIP que aseguran la mitad de la contractilidad sin llevar a cabo el proceso experimental, se puede aproximar el orden de magnitud que este valor podría tener. Para ello se puede utilizar como referencia el EC_{50} de las diferentes moléculas inhibitoras del canal TRPM4; dentro de ellas el represor más empleado en investigaciones corresponde al 9-fenantrol. El comportamiento de esta molécula ha sido caracterizado, obteniéndose que al emplear una concentración de $3,3 \mu\text{M}$, es posible

inhibir el 50 % de la contracción muscular del detrusor en ratas. Otra molécula conocida por su capacidad inhibitoria del canal, corresponde al ácido flufenámico el cual posee un EC_{50} de 2,8 μM . [51][52]

Una vez finalizadas la pruebas preclínicas, se espera avanzar a la fase clínica del estudio; etapa para la cual es necesario contar con la información de los medicamentos empleados actualmente en el tratamiento de la incontinencia urinaria. En este contexto, los valores de EC_{50} para algunos fármacos anticolinérgicos empleados en la terapia de la UUI, son 64 nmol/kg, 410 nmol/kg y 200 nmol/kg para la darifenacina, solifenacina y oxibutinina, respectivamente. [53][54] Con este mismo objetivo, se ha investigado el valor de este parámetro para el agonista de los receptores beta 3, conocido como mirabegrón. Luego de múltiples investigaciones se ha determinado que la concentración de fármaco que produce este efecto corresponde a 5,1 μM . [55] De este modo, se puede concluir que se prevé que la concentración de péptido que inhiba la contracción muscular en un 50 % este entre 1 y 10 μM , y sea farmacológicamente competitivo con los tratamientos actuales.

4.4. Trafico canal TRPM4

El análisis del tráfico del canal TRPM4 es un estudio original y novedoso, que busca determinar de manera precisa las proteínas EB involucradas en cada etapa del tráfico anterógrado. Lamentablemente, y debido a la falta de fundamento teórico, no es posible proponer un mecanismo para el tráfico del canal TRPM4 en las células de músculo detrusor, sin embargo, se pueden exponer algunos resultados esperados. Últimas investigaciones han indicado la existencia diferencial de las proteínas EB en el tejido vesical humano. Específicamente, se plantea que ni la proteína EB2, ni la EB3 están presentes en las células del urotelio humano, lo que podría evidenciar la importancia de la proteína EB1 en el tráfico del canal por sobre las proteínas EB2 y EB3, esto debido a la presencia de esta macromolécula en ambos tejidos. [56][57][58]

Para determinar la velocidad de tráfico del canal, desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de golgi o desde este último hasta la membrana plasmática, de forma automatizada se creo el código Matlab presentado en la sección A que le permite al usuario separar la imagen a estudiar en los canales rojo, verde y azul, y demarcar manualmente las estructuras a analizar en cada una de ellas. De esta forma el usuario puede obtener el valor de la distancia entre estructuras destacadas con marcadores cuya emisión sea de distinta longitud de onda.

4.5. Desarrollo Farmacológico

El desarrollo y la posterior aprobación de un fármaco es un proceso largo y minucioso que requiere de muchos estudios y análisis. Particularmente, en este documento se propone iniciar la investigación estableciendo la concentración de péptido SWIP que produce la inhibición del 50 % de la respuesta contráctil. Para ello se plantea realizar un estudio de tensión *ex vivo*, empleando vejigas de ratones según la metodología presentada en la sección 3.2.

Una vez definido el EC_{50} del modelo *ex vivo* este valor debe ser validado en un modelo animal (*in vivo*), y se debe analizar la cinética del fármaco por medio del estudio de las

vías de absorción, distribución, metabolización y excreción de este. Usualmente, los primeros estudios asociados a estas vías se llevan a cabo en un modelo animal (*in vivo*), y pueden ser realizados en ratones, ratas u otro animal cuyo genoma y sistema inmunológico sea similar al de los humanos. Concretamente, uno de los péptidos capaces de penetrar la membrana celular estudiados hoy en día, corresponde al péptido AM-111 que actúa como inhibidor de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK). Actualmente, esta droga se encuentra en la fase III del desarrollo farmacológico, y se está estudiando su potencial uso como tratamiento para la pérdida de audición. Justamente, el análisis cinético de este fármaco se realizó observando un cultivo de explante del órgano de Corti extraído de ratones, y haciendo un estudio de inmunocitoquímica de los tejidos. [59]

En cuanto al estudio de las vías de absorción y distribución del péptido, se propone administrarlo por medio de un implante subcutáneo y analizar la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de este; este análisis debe repetirse a distintas concentraciones de péptido para obtener la relación entre concentración de administración y concentración plasmática de la droga. De esta manera se puede determinar la fracción de péptido administrado que llega al torrente sanguíneo, facilitando el cálculo de la concentración de administración requerida para obtener una concentración plasmática igual al EC_{50} . Particularmente, en este estudio se propone administrar la droga mediante un dispositivo intradérmico denominado bomba osmótica, ya que este sistema asegura el suministro continuo del fármaco a una tasa constante, lo que permite estudiar el efecto del péptido en el estado estacionario.

Con respecto al estudio de las vías de metabolización y excreción del péptido, se plantea llevarlo a cabo analizando la concentración del fármaco en la orina y el plasma sanguíneo; además de evaluar la diferencia existente entre la concentración de droga que ingresa al hígado, mediante la arteria hepática y la vena porta, y la concentración del péptido en la vía de salida del hígado (venas hepáticas). Realizando el procedimiento mencionado anteriormente, se puede determinar la vía de metabolización predominante y se pueden proponer modificaciones estructurales a realizar en el péptido para disminuir su tasa de degradación. Este estudio también permite recabar información asociada al tiempo de vida media del fármaco y el tiempo requerido para llegar a la concentración plasmática deseada en el sistema (tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario).

Tanto para los estudios de administración y distribución, como para la investigación de las vías de metabolización y excreción se pueden analizar las muestras de sangre y orina, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o por inmunofluorescencia, ya que el péptido SWIP contiene un marcador de hemaglutinina que permite su cuantificación. Cabe destacar que se espera que la concentración del péptido en la orina sea mayor que la del plasma sanguíneo debido al tamaño del fármaco y sus propiedades físicas.

Otro aspecto importante a estudiar corresponde a la seguridad, toxicidad, y la efectividad de uso del péptido SWIP como tratamiento para la incontinencia urinaria. En particular, para el análisis de la seguridad y la toxicidad se sugiere observar los cambios en la presión arterial y el peso de los animales escogidos ante la infusión de fármaco por al menos tres semanas; de este modo el equipo investigador se puede asegurar de la inexistencia de consecuencias visibles e inmediatas del uso del péptido en animales. Además, se propone comparar la masa de péptido en el detrusor con la masa en el urotelio y estudiar los niveles de TRPM4

en la membrana plasmática mediante biotilación de la superficie de la célula. Asimismo se plantea determinar la dosis mínima capaz de generar efectos secundarios indeseados mediante la repetición de los análisis anteriores a concentraciones mayores de fármaco.

Por su parte, para estudiar la efectividad del péptido como tratamiento frente a la incontinencia urinaria, se plantea analizar la frecuencia de micción y la presión intravesical en un modelo *in vivo*. Para ello se propone emplear animales sometidos a una lesión medular o a los que se les haya inducido el síndrome de OAB por medio de la obstrucción parcial del cuello o la base de la vejiga. Por ejemplo, el estudio de efectividad del péptido AM-111 se realizó en conejillos de indias a los cuales se les produjo una infección en el oído denominada laberintitis. Posteriormente, se les adicionó durante 7 días la droga usando una bomba osmótica para ver el efecto del tratamiento con el péptido, y la mejora en la audición ante la exposición a distintos sonidos. [60]

También, se deben observar los efectos conductuales, morfológicos y funcionales generados en el modelo animal ante el tratamiento con distintas dosis del fármaco en estudio. Con este fin, se propone estudiar por al menos seis meses el modelo animal, y evaluar los posibles efectos secundarios que tendrá el uso del péptido como terapia farmacológica de largo plazo contra la incontinencia urinaria en seres humanos. Una vez finalizado el periodo de observación, se plantea inducir la eutanasia de los animales y observar los cambios en las diferentes estructuras mediante la necropsia de los cuerpos de los animales fallecidos. En concreto, en el estudio del péptido AM-111, se analizan por diferentes técnicas histológicas los tejidos de los animales tratados con diferentes dosis de droga. [61]

Una vez que se estudian los parámetros indicados anteriormente (en el modelo animal) se concluye la efectividad del fármaco, y se garantiza la inexistencia de efectos secundarios y de comportamientos anormales en el animal se inicia la fase I del estudio. Esta etapa se caracteriza por la evaluación de la farmacocinética y farmacodinamia del péptido en seres humanos sanos. Para esta fase se propone reclutar entre 20 y 100 personas sanas para acceder de manera voluntaria al estudio. El objetivo de esto, corresponde a escalar en un modelo humano *in vivo* la dosis administrada en el modelo animal, evaluar nuevamente los efectos secundarios y determinar el sistema de administración del fármaco que permita la mejor dosificación para el paciente.

Se plantea calcular en el inicio de la etapa I la dosis equivalente en humanos (Human Equivalent Dose, HED) de la masa de péptido a inyectar y el factor de seguridad según el algoritmo presentado en (US Department of Health and Human Services, 2005). Luego de determinar los elementos indicados anteriormente, se propone realizar el cálculo de la dosis inicial máxima recomendada (Maximum Recommended Starting Dose, MRSD) y comenzar las pruebas en humanos empleando el MRSD como límite superior para primera dosis analizada. [62]

Posteriormente se propone empezar la fase II del estudio, la cual tiene como objetivo evaluar la seguridad y eficacia del péptido en un grupo de voluntarios diagnosticados con incontinencia urinaria. Para este análisis se propone separar a los voluntarios en tres o más grupos, dependiendo del número de concentraciones de péptido a estudiar. De este modo se puede observar la inhibición de la contracción muscular ante diferentes dosis de péptido, al mismo tiempo que se registran los efectos secundarios producidos por el uso de la droga.

Adicionalmente, este estudio permite determinar la dosis más alta que puede administrarse en humanos sin que se produzcan efectos secundarios graves. Se propone llevar a cabo este estudio con aproximadamente 300 voluntarios entre 18 y 70 años, priorizando el ingreso de voluntarios mayores de 50 años, ya que este es el principal grupo etario con problemas de incontinencia urinaria. Lo anterior, es determinado en base al estudio de seguridad, eficiencia y dosis-respuesta del fármaco AM-111, en el cual se observaron aproximadamente 210 pacientes entre 18 y 61 años con daño auditivo, y se evaluó su capacidad auditiva al séptimo día luego de inyectar entre 0.4 y 2.0 mg/mL de péptido o placebo.

Finalmente, y con el objetivo de lograr la aprobación por la FDA, se debe llevar a cabo la fase III del estudio en la cual se propone analizar el efecto del péptido SWIP en un grupo de voluntarios con incontinencia urinaria. De esta forma se evalúa el funcionamiento del fármaco y se compara su eficiencia con la terapia farmacológica actual, además de examinar los efectos secundarios a corto y largo plazo. Este periodo es el más largo del estudio, ya que se debe demostrar que la droga analizada es al menos igual de segura y efectiva que las drogas empleadas hoy en día para el mismo propósito. Debido a lo anterior, se propone realizar este estudio por al menos 6 meses con observación constante de los voluntarios. En concreto, en el estudio del fármaco AM-111, esta fase constó de la observación continua de los pacientes hasta 13 semanas luego de la inyección de tratamiento. [63] Para demostrar la seguridad y eficiencia de la droga, y evitar el juicio del investigador, se plantea realizar las pruebas evitando que el voluntario y el investigador sepan las dosis de tratamiento o el tipo de droga administrada (péptido SWIP o placebo). Asimismo, se propone calcular el número de participantes de esta etapa empleando la ecuación B.1, sin embargo se cree que el número de participantes estará entre los 300 y 3.000 voluntarios. [64]

4.6. Diseño Productivo Preliminar

Actualmente existen dos formas de sintetizar proteínas de manera dirigida: síntesis química y síntesis recombinante, donde ambas son capaces de producir proteínas activas y correctamente plegadas. El primer tipo de producción corresponde a la adición continua de aminoácidos previamente tratados a la cadena peptídica mediante la inducción de enlaces peptídicos. Esta técnica, comúnmente usada a baja escala, se emplea en la síntesis de proteínas tóxicas, proteínas con aminoácidos no proteínogénicos, con modificaciones postraduccionales complejas o en aquellas proteínas cuya estructura terciaria y/o cuaternaria es compleja. Este mecanismo de producción también es empleado para el estudiar la relación entre la estructura y la función de una proteína, o para analizar el efecto de la inserción de ciertos enlaces de hidrógeno o disulfuro en posiciones específicas.

El método de síntesis química es usado en casos especiales y a bajas tasa de producción, ya que no es rentable a gran escala debido a la baja velocidad y eficiencia del proceso. Cabe mencionar que la baja eficiencia del proceso está asociada a la producción de péptidos incompletos o con enlaces en posiciones inadecuadas. Otra de las desventajas de este proceso corresponde al excesivo uso de solventes en las etapas de adición y lavado, lo que lo cataloga como un sistema de producción no amigable con el medio ambiente. [65][66]

Por el contrario, la síntesis recombinante de proteínas explota el conocimiento actual sobre la traducción y transcripción de genes, el entendimiento de la fisiología celular y los factores involucrados en la expresión heteróloga de genes. Al emplear este tipo de sistemas se evitan problemas tales como la disponibilidad de aminoácidos y la contaminación ambiental, puesto que la materia prima es sintetizada directamente por los organismos y sus subproductos no son dañinos para el ambiente. [67] A causa de lo anterior, y debido a que este péptido no posee una estructura terciaria o cuaternaria que dificulte el correcto posicionamiento de los aminoácidos, ni aminoácidos tipo D en su estructura, se propone producir el péptido SWIP de manera recombinante. [68][69]

4.6.1. Proceso de producción de la proteína recombinante

Desde sus inicios, la biofarmacéutica se ha caracterizado por su constante desarrollo y búsqueda de sistemas que permitan optimizar el proceso de producción. Dentro de estos, destaca el uso de bacterias, levaduras, células de insectos y células animales, donde estas últimas son las más empleadas para la producción de fármacos con modificaciones postraduccionales. [65] Al analizar la estructura del péptido SWIP se puede evidenciar que este no contiene puentes disulfuro ni modificaciones postraduccionales, por lo que no se recomienda el uso de cultivos animales debido a sus altos costos de producción y la alta tasa de contaminación del cultivo asociada. [70]

Adicionalmente, en la actualidad un tercio de los productos recombinantes son sintetizados en cultivos de *E. coli* debido al exhaustivo conocimiento de su genoma, fisiología y sistemas de expresión, además de la alta tasa de crecimiento bacteriano, y los bajos costos asociados a su cultivo y a la operación del proceso. El uso de este organismo como fábrica de proteínas remonta al año 1970 con la producción recombinante de insulina humana y el nacimiento oficial de la industria biofarmacéutica. Desde entonces se ha posicionado como el mayor organismo productor debido a su alta versatilidad. A razón de los antecedentes presentados anteriormente, se propone llevar a cabo la producción del péptido, usando como organismo recombinante la bacteria *E. coli*.

Específicamente, en este estudio se plantea usar la cepa recombinante *E. coli* BL21(DE3), ya que se encuentra optimizada para su uso como organismo huésped, y posee silenciados los genes de la proteasa OmpT que se encuentra en la membrana externa de la bacteria y escinde selectivamente los enlaces entre pares de aminoácidos alcalinos. De este modo, esta cepa presenta un menor riesgo de degradación del péptido objetivo durante el cultivo e incrementa la productividad. [71]

También destacan dentro de las propiedades de la cepa, la baja producción de acetato como metabolito secundario y la alta tasa de síntesis del producto primario asociada a la incorporación en su genoma del operón Lac que contiene los genes codificantes para la polimerasa T7. En este organismo la polimerasa T7 es sintetizada una vez que se induce la expresión mediante lactosa o isopropil- β -D-tiogalactopirano (IPTG). De esta forma se pueden transcribir los genes de interés añadidos previamente al organismo huésped por la transformación con plasmidios pET que poseen el promotor T7. [71]

Adicionalmente, se propone optimizar el uso de codones escogiendo así, los codones más

empleados en *E. coli* para facilitar la expresión del péptido, además de transformar las células con el plasmidio pTXB1. Se selecciona este vector, ya que cuenta con un promotor T7 inducible por IPTG y resistencia a ampicilina, los cuales facilitan la iniciación de la transcripción y selección de los organismos recombinantes, respectivamente. Por otro lado, este plasmidio es uno de los vectores empleados en el sistema IMPACT (por sus siglas en inglés, Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) que permite purificar en una sola cromatografía la proteína de interés sin tener que utilizar proteasas; evitando así, poner en riesgo la integridad del péptido y disminuyendo los costos de las etapas siguientes. La estructura del plasmidio pTXB1 se presenta en la siguiente figura (ver figura 4.7). El sistema IMPACT se encuentra explicado en detalle en la sección 4.6.4.

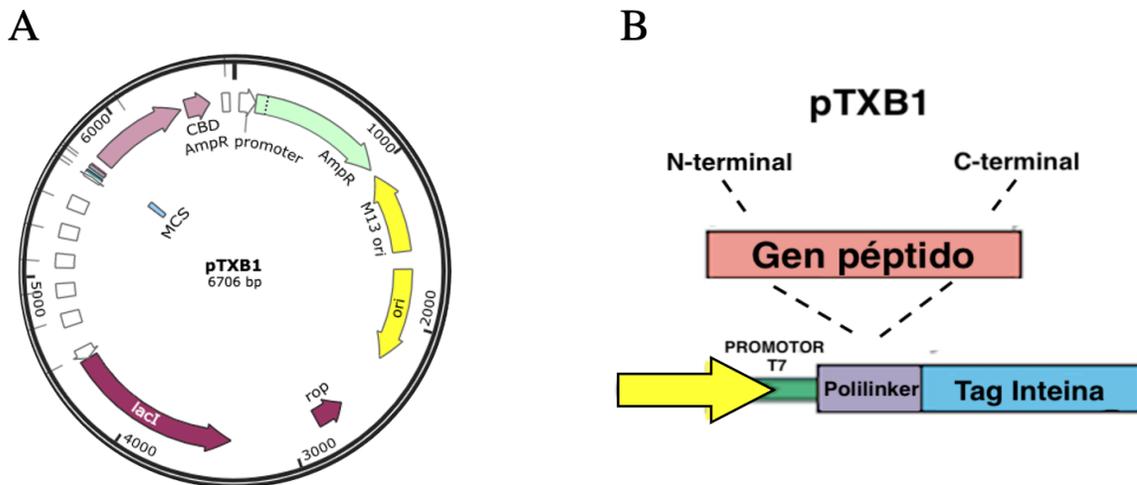


Figura 4.7: Estructura plasmidio pTXB1.

La figura A presenta la estructura general del plasmidio pTXB, donde se destaca el origen de replicación (amarillo), el gen de resistencia a ampicilina (verde) y el operador lac y la secuencia codificante para la inteina (rosado). En la figura B se amplía un segmento del plasmidio pTXB1 y se presenta la disposición espacial del gen codificante y la secuencia genética de la inteina necesaria para el sistema IMPACT. Modificado de [72].

La producción del péptido en este organismo se da en forma de cuerpos de inclusión, lo que permite lograr altos valores de concentración intracelular y obtener un alto nivel de pureza de la proteína en los cuerpos de inclusión. Es más, en múltiples investigaciones ha indicado que al producir la macromolécula en forma de cuerpos de inclusión, el 25 % las proteínas totales producidas corresponden a la de interés y la pureza de esta en los cuerpos de inclusión puede llegar al 95 %. Asimismo, la formación de cuerpos de inclusión facilita las siguientes etapas de separación y purificación, puesto que presentan una mayor densidad y tamaño que las impurezas producidas en el cultivo, por lo que una simple etapa permite realizar una correcta separación entre el péptido de interés y los desechos. Además, al sintetizar los péptidos en forma de cuerpos de inclusión y emplear cultivos de alta densidad celular se logra una mayor productividad por volumen de cultivo.[73] [74]

Para la producción industrial, se propone utilizar un sistema de cultivo fed-batch que permita facilitar el crecimiento de biomasa e inducir la síntesis del péptido una vez alcanzada la densidad celular deseada. De este modo se incrementa la masa celular para maximizar la acumulación de proteína en las bacterias y se logran mayores rendimientos por volumen de cultivo. Además, se sugiere añadir glucosa al cultivo a una tasa igual a la tasa de consumo, y mantener la concentración de sustrato cercana a cero. Este sistema permite obtener una concentración de biomasa seca (Cell Dry Weight, CDW) de aproximadamente 54 g/L. [69][75]

Con respecto al medio de cultivo se propone evaluar el uso de glicerol como fuente de carbono, ya que en el estudio realizado por (Kopp et. al, 2017) asociado al cultivo recombinantes de *E.coli* BL21(DE3) se registró un rendimiento de biomasa en glicerol ($Y_{X/S}$) de $0,44 \pm 0,1$ durante la fase de inducción. Más aún, en estos estudios se concluye que su uso genera mayores beneficios en la viabilidad celular y en la producción de proteínas recombinantes en comparación al uso de glucosa. [76] El uso de glicerol también permite disminuir los costos de producción, puesto que este posee un valor comercial de entre US\$ 0,09 - 0,2 por kilogramo, el cual es considerablemente menor que el de las fuentes de carbono comúnmente empleadas en cultivos celulares. [77]

4.6.2. Separación

Para separar las células del medio de cultivo a nivel industrial, se pueden realizar tres operaciones diferentes: centrifugación, filtración o microfiltración, donde la primera se basa en la diferencia de densidades existente entre el organismo y el medio de cultivo, y la adición de un campo gravitacional externo; y las últimas dos se valen de la diferencia de tamaño entre el organismo y las moléculas de desecho, y la aplicación de una fuerza externa que aumenta la energía del flujo a filtrar. Si bien se pueden emplear ambos sistemas, para este caso se sugiere realizar la separación por medio de una microfiltración del medio de cultivo debido a la facilidad de uso y a su menor costo económico. [78]

En este proceso de separación se recomienda utilizar una membrana de fibra hueca y posicionarla a la salida del reactor. De este modo, la formación de torta disminuye, y por ende, la resistencia al paso del fluido lo que genera un menor costo de operación. La disminución en la formación de torta se debe a que el flujo es transversal al área de filtrado y por lo tanto existe un barrido constante del material acumulado. Asimismo, al trabajar grandes volúmenes de cultivo este sistema de separación es el más rentable del mercado.

En la figura 4.8 se presentan los flujos que intervienen en el proceso de filtración celular. La corriente denominada permeado corresponde al medio de cultivo y el flujo denominado concentrado corresponde a la corriente con mayor biomasa (esta será el flujo a tratar en las siguientes etapas). Para aumentar la eficiencia y disminuir el consumo de reactivos se propone que una fracción del permeado sea reincorporado al proceso.

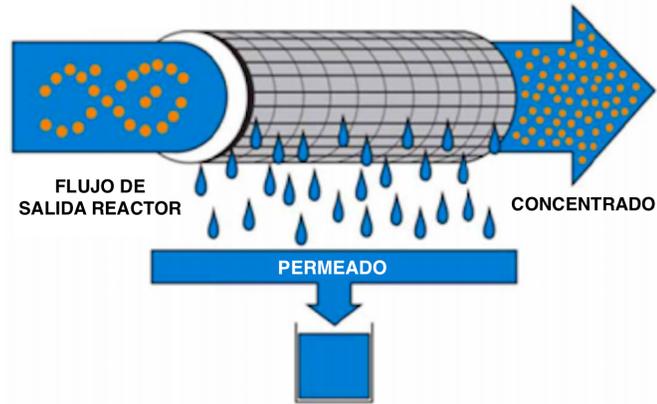


Figura 4.8: Membrana de microfiltración de fibra hueca.
 Los puntos amarillos representan las células recombinantes. Se indica que la concentración de células en la entrada del sistema es menor que la del concentrado. El permeado corresponde al medio de cultivo. Modificado de [79].

4.6.3. Lisis celular y separación

Debido a la producción de péptido recombinante en forma de cuerpos de inclusión, se debe romper la pared celular de las bacterias para lograr la extracción de este. Concretamente, en este proyecto se sugiere llevar a cabo la lisis celular mediante la adición de presión al cultivo o tratándolo con una fuerza externa. La ruptura mecánica puede realizarse empleando un homogeneizador de alta presión o un sonicador, ya que al estar trabajando con cuerpos de inclusión, la denaturación de la proteína de interés por incremento de temperatura no es un inconveniente. Específicamente se sugiere realizar el proceso empleando el homogeneizador de alta presión, ya que es uno de los sistemas más empleados en la lisis de bacterias a nivel industrial debido a su capacidad y menor costo energético, además se puede emplear en un sistema continuo lo que disminuye el tiempo de tratamiento.[78] El equipo propuesto se presenta en la figura 4.9.

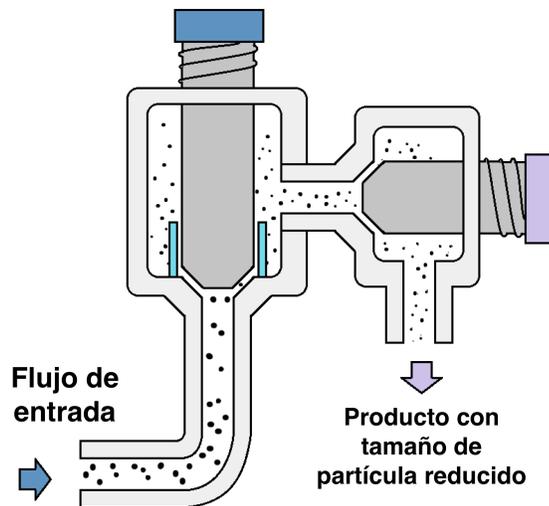


Figura 4.9: Homogeneizador de alta presión.

Representa la estructura del sistema de lisis celular propuesto, el flujo de entrada corresponde al concentrado de la microfiltración anterior y el producto con tamaño de partícula reducido corresponde al flujo de entrada para la siguiente separación. Modificado de [80].

Una vez finalizada la lisis celular, y con el objetivo de separar los cuerpos de inclusión de la debris celular, el ADN y las proteínas contaminantes, se plantea llevar a cabo una filtración de flujo cruzado, de este modo se evita la formación de torta y se disminuye la resistencia generada por esta. Por lo demás, en las últimas investigaciones se ha logrado determinar que este tipo de filtración permite recuperar entre el 85 y 90 % de los cuerpos de inclusión totales, lo que incrementa la eficiencia y rentabilidad del proceso. [81]

Específicamente, se propone emplear una membrana de poliéster sulfona (PES) de tamaño de poro de $0,1 \mu\text{m}$, puesto que este material posee una mayor permeabilidad al agua y es capaz de retener un gran porcentaje del péptido. [82]

4.6.4. Replegamiento y purificación del péptido

Una vez separados los cuerpos de inclusión del material de desecho, se recomienda llevar a cabo el replegamiento de los péptidos adicionando urea al medio. Al agregar este compuesto químico a la solución se incrementa la fuerza iónica del medio disminuyendo la interacción entre los grupos iónicos superficiales de los cuerpos de inclusión, y las moléculas de agua. Posteriormente, se sugiere adicionar solvente al medio para diluirlo, evitar la interacción entre los péptidos y lograr su adecuado ensamblaje.

Por otro lado, se plantea realizar la purificación de los péptidos mediante una cromatografía de afinidad y empleando el sistema IMPACT mencionado anteriormente. Esta técnica se basa en los siguientes principios: la interacción entre el sitio de unión a quitina del pép-

tido y la matriz de quitina, y la actividad autoproteolítica de las inteínas. En este caso, el plasmidio sugerido para la transformación (pTXB1) posee una secuencia nucleotídica que codifica para la síntesis de la inteína y para sitio de unión a quitina, además de poseer un sitio polilinker donde se puede adicionar la secuencia nucleotídica del péptido SWIP. Todos los motivos indicados anteriormente, están posicionadas luego del promotor T7, por lo que la proteína de interés es transcrita junto a estos elementos.

Gracias a la presencia del sitio de unión a quitina en el transcrito, la secuencia proteica completa (incluyendo el péptido de interés) queda retenida en la resina de quitina durante la cromatografía de afinidad logrando una separación eficiente. Para inducir el desprendimiento del péptido SWIP y estimular la actividad proteolítica de la inteína, se propone adicionar ditiotretitol durante la fase de elución, puesto que la presencia del grupo funcional tiol induce la actividad proteolítica de la inteína. Este proceso se presenta en el siguiente esquema (ver figura 4.10) donde la secuencia del péptido SWIP es adicionada en el segmento marcado por color morado mediante la incisión con enzimas de restricción.

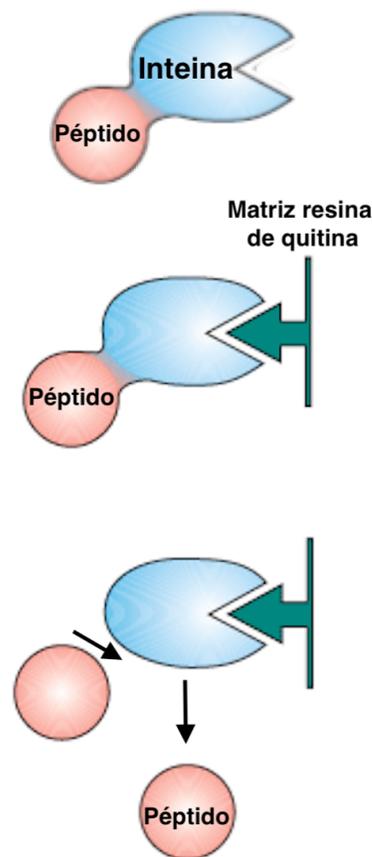


Figura 4.10: Esquema del sistema IMPACT.

Mecanismo de purificación empleado en el sistema IMPACT. Se indica la unión la inteína y la matriz de resina de quitina, y la posterior liberación del péptido. Modificado de [72].

Otro mecanismo de purificación posible corresponde a realización de una cromatografía de intercambio iónico y luego una cromatografía de afinidad, de este modo se puede sintetizar

el péptido sin el sistema IMPACT, disminuyendo costos de producción. Asimismo, en caso de requerir una nueva etapa de purificación que disminuya la presencia de contaminantes, es posible realizar una cromatografía de filtración en gel complementaria a las cromatografías mencionadas anteriormente.

4.6.5. Liofilización y envasado

Luego del replegamiento y la purificación del péptido, se propone realizar la liofilización de este. Este proceso consiste en la extracción del agua de una muestra bajo condiciones específicas, particularmente en presencia de vacío y a bajas temperaturas. Esta técnica permite almacenar sustancias delicadas sin que se deterioren, lo que permite que sea ampliamente utilizada en la industria farmacéutica en la producción de antibióticos, sueros y vacunas, entre otros productos biotecnológicos.

El proceso de liofilización cuenta con tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario de la muestra. Durante la congelación se enfría el péptido produciendo la nucleación del agua y generando cristales de distintas formas y tamaños. Existen múltiples parámetros que afectan esta etapa, entre ellos destaca la presencia de sustancias no cristalizantes, el porcentaje de agua y la velocidad de congelación, por lo que es necesario determinar experimentalmente las condiciones y el método de congelación a emplear para minimizar el porcentaje de péptido denaturado. Con el fin de optimizar este proceso y elegir las condiciones ideales de congelación, se propone llevar a cabo de manera conjunta una espectroscopia infrarroja y espectrometría de masas del péptido. [83]

Una vez congelada la muestra esta es sometida al proceso de sublimación mediante la adición de calor. Es importante mantener la temperatura de sublimación constante durante todo el proceso para evitar el sobrecalentamiento de la zona exterior y el deterioro del fármaco. Luego de sublimar completamente el hielo, se inicia el secado final que tiene como objetivo extraer el agua remanente no congelada y disminuir la humedad para garantizar la conservación del péptido. [84]

Cabe señalar, que si bien tanto la etapa de congelación como las etapas de secado producen estrés en la muestra, debido a la exposición a condiciones extremas, se propone realizar este proceso puesto que es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, además de que la estructura del péptido SWIP es simple, sin presencia de estructuras terciarias ni cuaternarias, por lo que su uso no presenta mayores problemas. [83]

Finalmente, se propone envasar el péptido liofilizado y administrarlo en forma de implante subcutáneo o de bomba osmótica para asegurar una tasa de liberación constante, además de evitar la necesidad de administración diaria mejorando el bienestar de los pacientes con incontinencia urinaria. Entre las ventajas de este sistema, se encuentra que este mecanismo no se ve afectado por factores externos tales como pH, presencia de alimentos o por las condiciones hidrodinámicas y enzimáticas del medio. Asimismo, este mecanismo posee una mayor tasa de liberación que los sistemas de difusión normales. Dependiendo del sistema a utilizar, la duración del fármaco será entre 6 a 12 meses.

Cabe mencionar que se propone realizar este sistema de envasado para la síntesis del

péptido para los estudios preclínicos, sin embargo también se propone analizar la compra del servicio de liofilizado y envasado para facilitar el proceso y asegurar los estándares de calidad.
[85][86]

4.7. Costos de producción: Fase preclínica y clínica

Para determinar la masa aproximada de péptido a emplear en la fase preclínica, se calculó la masa necesaria para llevar a cabo el ensayo de tensión y el estudio de seguridad del péptido en ratones. Las ecuaciones empleadas y la metodología realizada para calcular la masa necesaria se encuentran en las secciones B y C, respectivamente. De esta manera se determinó que se debe producir $1,54 \text{ m}^3$ de cultivo celular recombinante para sintetizar aproximadamente 1 gramo de SWIP.

Por otro lado, se determinan los costos de inversión asociados a la producción recombinante de péptido SWIP, obteniéndose que estos corresponden a aproximadamente 85.000 dolares, el cual está sobreestimado, puesto que el rendimiento presentado en la investigación de (Rodríguez et. al, 2015) de $0,65 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$, es menor que el obtenido en las últimas publicaciones.

Los US \$85.000 mencionados en el párrafo anterior equivalen al costo de adquirir en el mercado 14 gramos de péptido producido por síntesis química en empresas expertas en el rubro de la síntesis de macromoléculas tales como Genscript y Biomatik, ya que el valor de compra de un gramo de péptido sintetizado químicamente en estas empresas es de aproximadamente 6.000 dólares. Debido a lo anterior, se estima que para los estudios preclínicos no es recomendable sintetizar el péptido de manera recombinante, y que la adquisición del fármaco se debería realizar directamente con una de las empresas mencionadas anteriormente. Las cotizaciones realizadas en estas empresas se encuentran en la sección F.

Si bien no es posible determinar la masa de péptido necesaria para la fase clínica, es posible aproximar la HED usando la conversión presentada por la FDA. Suponiendo que la concentración plasmática requerida será de 50 nM (valor referencial empleado en los análisis de consecuencias morfológicas del uso del péptido), se obtiene el requerimiento por persona de péptido SWIP por semana es 1,4 gramos. Más aún, debido a que la masa de un ser humano es aproximadamente 2.000 veces mayor que la de un ratón promedio, se espera que la síntesis recombinante sea el sistema más eficiente y económico para la producción del péptido SWIP, ya que el costo asociado a la síntesis química de 14 o más gramos de péptido no es rentable puesto que a partir de esa masa se iguala el precio de adquisición con los costos relacionados a la compra y uso de equipos en el proceso recombinante.

Capítulo 5

Conclusión

Al observar las muestras de tejido vesical es posible concluir la correcta penetración de fármaco en el tejido epitelial y muscular; además de su correcta acumulación en el citoplasma y la membrana plasmática de las células vesicales. Adicionalmente, se comprobó el incremento del tamaño de las fibras musculares, lo cual podría deberse a un efecto secundario del péptido denominado hiperplasia epitelial. Más aún, al cuantificar el número de núcleos existentes por mm^2 , se observó la disminución de la densidad celular, siendo de 305, 270 y 174 células/ mm^2 para tejidos musculares de animales tratados sin péptido, con péptido ΔSWIP y con péptido SWIP, respectivamente.

Posteriormente se diseñó un modelo cuantitativo que permitiese determinar el efecto inhibitorio del péptido SWIP sobre el músculo detrusor de la vejiga. Para ello, se propuso estudiar la contractibilidad muscular, y la farmacocinética y farmacodinamia del péptido. Adicionalmente, se propone comparar los resultados obtenidos con los valores obtenidos para la terapia farmacológica actual para determinar la eficiencia y competitividad de la droga estudiada.

Para evaluar el tráfico del canal TRPM4 desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática se propuso detectar el movimiento del canal mediante el sistema RUSH y calcular la velocidad de tráfico empleando el código Matlab presentado en anexos. Asimismo, se propone emplear la interfaz de Matlab, Matcol, para evaluar el nivel de colocación entre el canal y las estructuras celulares.

Con respecto a la producción del péptido a nivel industrial, se recomienda llevar a cabo la síntesis recombinante empleando como organismo huésped la bacteria *E.coli* BL21(DE3) y como vector de transformación al plasmidio pTXB1. Asimismo, se recomendó realizar un cultivo fed-batch que permita en un comienzo incrementar la biomasa y posteriormente inducir la síntesis del péptido. Para la separación de los contaminantes, se sugirió realizar una cromatografía de afinidad mediante el sistema IMPACT. Finalmente, se propuso administrar el péptido reconstituido en forma de implante intradérmico o bomba osmótica para permitir la liberación continua del fármaco.

Por último se recabó información respecto a los costos asociados a la compra de equipos para la producción recombinante, obteniendo un gasto de aproximadamente 85.000 dólares. Cabe mencionar que este valor está sobreestimado, ya que el rendimiento de péptido por litro

de cultivo es menor que lo mencionado en las últimas investigaciones, por lo que se propone optimizar el sistema de producción y realizar una nueva evaluación económica posterior a la optimización. Por otro lado se determinó el valor de mercado de la compra directa del fármaco, siendo este de aproximadamente 6.000 dólares por gramo de péptido. Al comparar estos valores se concluyó que, para masas superiores a los 14 gramos, la síntesis recombinante es la opción más rentable. Más aún, el laboratorio donde se realizó la investigación se caracteriza por desarrollar péptidos inhibidores de canales iónicos, por lo que la compra de los equipos permitiría el uso de estos para la síntesis de múltiples macromoléculas recombinantes.

Bibliografía

- [1] P. Abrams, L. Cardozo, M. Fall, D. Griffiths, P. Rosier, U. Ulmsten, P. Van Kerrebroeck, A. Victor, and A. Wein, “The standardisation of terminology in lower urinary tract function: Report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society,” *Urology*, vol. 61, no. 1, pp. 37–49, 2003.
- [2] L. J. Romanzi, “Management of Overactive Bladder,” *CNS Spectrums*, vol. 9, no. 12, p. 8, 2004.
- [3] I. Milsom, K. S. Coyne, S. Nicholson, M. Kvasz, C.-i. Chen, and A. J. Wein, “Global Prevalence and Economic Burden of Urgency Urinary Incontinence : A Systematic Review,” *European Urology*, 2013.
- [4] C. Lukacz, E. S. Sampsel, M. Gray, S. MacDiarmid, M. Rosenberg, P. Ellsworth, and M. H. Palmer, “A healthy bladder: A consensus statement,” *International Journal of Clinical Practice*, vol. 65, no. 10, pp. 1026–1036, 2011.
- [5] L. M. A., “Incontinencia urinaria femenina,” *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, vol. 40, pp. 185–190, 1989.
- [6] J. Girona, L.; Conejero, “Capítulo Urología,” *Farmacía Hospitalaria*, pp. 1602–1624, 2015.
- [7] B. D. Editors, “Transitional Epithelium,” 2017.
- [8] L. E., W. E., L. J. N. C., and L. K., “Urinary frequency in community-dwelling women: what is normal?,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 200, 2009.
- [9] W. Xin, N. Li, Q. Cheng, V. S. Fernandes, and G. V. Petkov, “Constitutive PKA activity is essential for maintaining the excitability and contractility in guinea pig urinary bladder smooth muscle: Role of the BK channel,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 307, no. 12, pp. C1142–C1150, 2014.
- [10] H. H. P. Harvard Medicine School, “Types of urinary incontinence,” 2014.
- [11] R. Of, “Neurophysiology of Lower Urinary,” vol. 5, pp. 3–10, 2003.
- [12] F. X. Elizalde Benito, *Evaluación de vejiga hiperactiva idiopática y neurogénica en España*. PhD thesis, Universidad de Zaragoza, 2015.
- [13] M. Hartman, A. Martin, P. McDonnell, and A. Catlin, “Contributes To Lowest Rate Of,” pp. 246–261, 2007.
- [14] T.-w. Hu, T. H. Wagner, J. D. Bentkover, K. Leblanc, A. M. Y. Piancentini, W. F. Stewart, R. O. N. Corey, S. Z. Zhou, and T. L. Hunt, “Estimated economic costs of overactive bladder in the united states,” vol. 4295, no. 03, pp. 1123–1128, 1995.

- [15] M. L. Ganz, A. M. Smalarz, T. L. Krupski, J. T. Anger, J. C. Hu, K. U. Wittrup-Jensen, and C. L. Pashos, “Economic Costs of Overactive Bladder in the United States,” *Urology*, vol. 75, no. 3, pp. 526–532, 2010.
- [16] G. Mukerji, Y. Yiangou, J. Grogono, J. Underwood, S. K. Agarwal, V. Khullar, and P. Anand, “Localization of M2 and M3 Muscarinic Receptors in Human Bladder Disorders and Their Clinical Correlations,” *Journal of Urology*, vol. 176, no. 1, pp. 367–373, 2006.
- [17] Vidal Vademecum Spain, “Oxibutinina,” 2009.
- [18] Vidal Vademecum Spain, “Tolterodina,” 2010.
- [19] Vidal Vademecum Spain, “Trospio,” 2015.
- [20] Vidal Vademecum Spain, “SOLIFENACINA ALTER Comp. recub. con película 10 mg,” 2019.
- [21] Vidal Vademecum Spain, “Darifenacina,” 2015.
- [22] Vidal Vademecum Spain, “Mirabegrón,” 2019.
- [23] G. S. Mcknight, “Cyclic AMP second messenger,” pp. 213–217.
- [24] K.-e. Andersson and M. C. Michel, *Urinary Tract: Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 202. New York: Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2011.
- [25] M. Raff, H. Levitzky, *Fisiología médica un enfoque por aparatos y sistemas*. 2013.
- [26] “CV Physiology | Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation.”
- [27] K. H. G. N. L. W. C. R. D. Xie, Yeming Han and B. A. Perrino, “A role for focal adhesion kinase in facilitating the contractile responses of murine gastric fundus smooth muscles,” *Journal of Physiology*, vol. 596, no. 11, pp. 2131–2146, 2018.
- [28] E. Muñoz Conejero, *Participación de los canales de calcio y las mitocondrias en la proliferación de las células del músculo liso vascular*. PhD thesis, Universidad de Valladolid.
- [29] E. Carbone, “Calcium Channels – An Overview,” in *Encyclopedia of Neuroscience*, pp. 545–550, Torino, Italia: Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [30] E. S. T. S. J. Catterall, W. Perez-reyes, “International Union of Pharmacology . XL-VIII . Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels,” vol. 57, no. 4, pp. 411–425, 2005.
- [31] H. Lodish, H. Lodish, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, and S. L. Zipursky, *Biología Celular y Molecular*. New York: Editorial Médica Panamericana, 5 ed., 2005.
- [32] I. P. N. Cruz D., María del Pilar Nacional, *Cambios en la reactividad de arterias epiploicas humanas asociados a insuficiencia renal crónica y diabetes mellitus tipo 2*. PhD thesis, Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina Posgrado, 2008.
- [33] J. H. S. Yoo, S. Lim, “Sensory TRP Channel Interactions with Endogenous Lipids and Their Biological Outcomes,” pp. 4708–4744, 2014.

- [34] M. X. Zhu, “TRP channels,” *TRP Channels*, pp. 1–464, 2016.
- [35] . Hyochol Ahn, et al, “Transient Receptor Potential (TRP) Channels,” *Physiology & behavior*, vol. 176, no. 10, pp. 139–148, 2017.
- [36] M. L. P. Guinamard, R. Demion, “Reviews: Physiological Roles of the TRPM4 Channel Extracted from Background Currents,” pp. 155–164, 2010.
- [37] A. C. Smith, S. P. Parajuli, K. L. Hristov, Q. Cheng, R. P. Soder, S. A. Y. Afeli, S. Earley, W. Xin, J. Malysz, and G. V. Petkov, “TRPM4 channel : a new player in urinary bladder smooth muscle function in rats,” no. 8, pp. 918–929, 2013.
- [38] P. Launay, A. Fleig, A.-l. Perraud, A. M. Scharenberg, R. Penner, and J.-p. Kinet, “TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization,” vol. 109, pp. 397–407, 2002.
- [39] R. Guinamard, C. Simard, and L. Sallé, *TRPM4*, pp. 5741–5749. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- [40] M. Cáceres, L. Ortiz, T. Recabarren, A. Romero, A. Colombo, E. Leiva-Salcedo, D. Varela, J. Rivas, I. Silva, D. Morales, C. Campusano, O. Almarza, F. Simon, H. Toledo, K. S. Park, J. S. Trimmer, and O. Cerda, “TRPM4 is a novel component of the adhesion required for focal adhesion disassembly, migration and contractility,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 6, pp. 1–23, 2015.
- [41] F. A. Kullmann, J. M. Beckel, B. McDonnell, C. Gauthier, A. M. Lynn, A. Wolf-johnston, A. Kanai, I. V. Zabbarova, W. C. D. Groat, and L. A. Birder, “Involvement of TRPM4 in detrusor overactivity following spinal cord transection in mice,” *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, pp. 1–20, 2019.
- [42] C. Blanco, D. Morales, I. Mogollones, A. Vergara-Jaque, C. Vargas, A. Álvarez, D. Riquelme, E. Leiva-Salcedo, W. González, D. Morales, D. Maureira, I. Aldunate, M. Cáceres, D. Varela, and O. Cerda, “EB1- and EB2-dependent anterograde trafficking of TRPM4 regulates focal adhesion turnover and cell invasion,” *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 33, no. 8, pp. 9434–9452, 2019.
- [43] F. A. Kullmann, S. L. Daugherty, W. C. de Groat, and L. A. Birder, “Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 90, pp. 1–11, 2014.
- [44] J. Malysz, E. S. Rovner, R. Wake, and G. V. Petkov, “Preparation and utilization of freshly isolated human detrusor smooth muscle cells for characterization of 9-phenanthrol-sensitive cation currents,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2020, no. 155, pp. 1–13, 2019.
- [45] Y. Cheng, K. J. Mansfield, S. L. Sandow, P. Sadananda, E. Burcher, and K. H. Moore, “Porcine bladder urothelial, myofibroblast, and detrusor muscle cells: Characterization and ATP release,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. JUN, no. June, pp. 1–9, 2011.
- [46] G. Boncompain, S. Divoux, N. Gareil, H. De Forges, A. Lescure, L. Latreche, V. Mercanti, F. Jollivet, G. Raposo, and F. Perez, “Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells,” *Nature Methods*, vol. 9, no. 5, pp. 493–498, 2012.

- [47] L. Zhao, P. Liu, G. Boncompain, F. Loos, S. Lachkar, L. Bezu, G. Chen, H. Zhou, F. Perez, O. Kepp, and G. Kroemer, "Identification of pharmacological inhibitors of conventional protein secretion," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [48] M. Khushi, C. E. Napier, C. M. Smyth, R. R. Reddel, and J. W. Arthur, "MatCol: A tool to measure fluorescence signal colocalisation in biological systems," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [49] T. Yamanishi, K. Kaga, M. Fuse, C. Shibata, T. Kamai, and T. Uchiyama, "The role of muscarinic receptor subtypes on carbachol-induced contraction of normal human detrusor and overactive detrusor associated with benign prostatic hyperplasia," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 128, no. 2, pp. 65–70, 2015.
- [50] M. J. Lee, J. H. Moon, H. K. Lee, C. H. Cho, S. H. Choi, and W. B. Im, "Pharmacological characterization of DA-8010, a novel muscarinic receptor antagonist selective for urinary bladder over salivary gland," *European Journal of Pharmacology*, vol. 843, no. November 2018, pp. 240–250, 2019.
- [51] C. S. C. D. N. Romain Guinamard, "Flufenamic acid as an ion channel modulator," *Pharmacology & Therapeutics - Journal - Elsevier*, vol. 138, no. 2, pp. 272–284, 2014.
- [52] A. C. Smith, S. P. Parajuli, K. L. Hristov, Q. Cheng, R. P. Soder, S. A. Y. Afeli, S. Earley, W. Xin, J. Malysz, and G. V. Petkov, "TRPM4 channel : a new player in urinary bladder smooth muscle function in rats," no. 8, pp. 918–929, 2013.
- [53] D. Guay, "Darifenacin : Another Antimuscarinic for Overactive Bladder," pp. 424–431, *The Consultant Pharmacist*, 20 ed., 2005.
- [54] K. Ikeda, S. Kobayashi, M. Suzuki, K. Miyata, M. Takeuchi, T. Yamada, and K. Honda, "M 3 receptor antagonism by the novel antimuscarinic agent solifenacin in the urinary bladder and salivary gland," pp. 97–103, 2002.
- [55] T. Hatanaka, M. Ukai, and M. Watanabe, "In vitro and in vivo pharmacological profile of the selective β 3 -adrenoceptor agonist mirabegron in rats," pp. 247–253, 2013.
- [56] The Human Protein Atlas project, "Tissue expression of MAPRE1 - Staining in urinary bladder - The Human Protein Atlas."
- [57] The Human Protein Atlas project, "Tissue expression of MAPRE2 - Staining in urinary bladder - The Human Protein Atlas."
- [58] The Human Protein Atlas project, "Tissue expression of MAPRE3 - Staining in urinary bladder - The Human Protein Atlas."
- [59] J. Wang, T. R. Van De Water, C. Bonny, F. De Ribaupierre, J. L. Puel, and A. Zine, "A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss," *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 24, pp. 8596–8607, 2003.
- [60] G. C. Barkdull, Y. Hondarrague, T. Meyer, J. P. Harris, and E. M. Keithley, "AM-111 reduces hearing loss in a guinea pig model of acute labyrinthitis," *Laryngoscope*, vol. 117, no. 12, pp. 2174–2182, 2007.
- [61] Y. Omotehara, N. Hakuba, N. Hato, M. Okada, and K. Gyo, "Protection against ischemic cochlear damage by intratympanic administration of AM-111," *Otology and Neurotology*,

- vol. 32, no. 9, pp. 1422–1427, 2011.
- [62] Center for Drug Evaluation and Research, “Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers,” *US Department of Health and Human Services*, no. July, pp. 1–27, 2005.
- [63] Auris Medical, “Protocol Version Final 3.0 dated 24 May 2017,” tech. rep., Chicago, IL., 2017.
- [64] F.& Drug Administration@, “The Drug Development Process | FDA,” 2018.
- [65] L. Raibaut, O. El Mahdi, and O. Melnyk, *Solid Phase Protein Chemical Synthesis*, pp. 103–154. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [66] L. Liu, “Chemical Synthesis of Proteins that cannot be Obtained Recombinantly,” pp. 64–70, 2019.
- [67] L. S. Garcia, L. Martín, R. Mangues, N. F. Miralles, E. Vázquez, and A. Villaverde, “Recombinant pharmaceuticals from microbial cells : a 2015 update,” *Microbial Cell Factories*, pp. 1–7, 2016.
- [68] Y. Li, “Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review,” *Protein Expression and Purification*, vol. 80, no. 2, pp. 260–267, 2011.
- [69] J. H. Choi, K. C. Keum, and S. Y. Lee, “Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli,” *Chemical Engineering Science*, vol. 61, no. 3, pp. 876–885, 2006.
- [70] J. Kopp, A. M. Kolkmann, P. G. Veleenturf, O. Spadiut, C. Herwig, and C. Slouka, “Boosting recombinant inclusion body production—from classical fed-batch approach to continuous cultivation,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, no. OCT, pp. 1–12, 2019.
- [71] G. J. Gopal and A. Kumar, “Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli,” *Protein Journal*, vol. 32, no. 6, pp. 419–425, 2013.
- [72] New England Biolabs, inc., “Protein Expression Purification Technologies: IMPACT™ Kit | NEB,” 2016.
- [73] G. Georgiou and P. Valax, “Isolating inclusion bodies from bacteria,” *Methods in Enzymology*, vol. 309, no. 1975, pp. 48–58, 1999.
- [74] E.-E. G. Campus, “Twin-arginine translocation pathway, signal sequence (IPR006311) - InterPro entry - InterPro.”
- [75] A. Schmideder and D. Weuster-Botz, “High-performance recombinant protein production with Escherichia coli in continuously operated cascades of stirred-tank reactors,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 44, no. 7, pp. 1021–1029, 2017.
- [76] J. Kopp, C. Slouka, S. Ulonska, J. Kager, J. Fricke, O. Spadiut, and C. Herwig, “Impact of glycerol as carbon source onto specific sugar and inducer uptake rates and inclusion body productivity in E. Coli BL21(DE3),” *Bioengineering*, vol. 5, no. 1, 2017.
- [77] A. A. Abdul Raman, H. W. Tan, and A. Buthiyappan, “Two-Step Purification of Glycerol as a Value Added by Product From the Biodiesel Production Process,” *Frontiers in Chemistry*, vol. 7, no. November, pp. 1–9, 2019.

- [78] M. P. Doran, *Engineering Principles Second Edition*. 2013.
- [79] P. S. Cartwright, “A unique zero liquid discharge system utilizing microfiltration technology,” *American Filtration and Separations Society Annual Conference 2012*, pp. 120–149, 2012.
- [80] P. Comuzzo and S. Calligaris, “Potential Applications of High Pressure Homogenization in Winemaking: A Review,” *Beverages*, vol. 5, no. 3, p. 56, 2019.
- [81] D. Hoffmann, M. Ebrahimi, D. Gerlach, D. Salzig, and P. Czermak, “Reassessment of inclusion body-based production as a versatile opportunity for difficult-to-express recombinant proteins,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 38, no. 5, pp. 729–744, 2018.
- [82] D. Kim, O. R. Salazar, and S. P. Nunes, “Membrane manufacture for peptide separation,” *Green Chemistry*, vol. 18, no. 19, pp. 5151–5159, 2016.
- [83] W. Wang, *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*, vol. 203. 2000.
- [84] GEA Group Aktiengesellschaft 2020, “Fundamentos de la liofilización farmacéutica.”
- [85] P. Agarwal and I. D. Rupenthal, “Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs,” *Drug Discovery Today*, vol. 00, no. 00, pp. 1–13, 2013.
- [86] J. Dahms, J. P. Carr, and S. D. Lautenbach, “DUROS® Technology Delivers Peptides and Proteins at Consistent Rate Continuously for 3 to 12 Months,” vol. 2, no. 3, pp. 461–467, 2008.
- [87] “Novel role for the transient potential receptor melastatin 4 channel in guinea pig detrusor smooth muscle physiology,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 304, no. 5, pp. 467–477, 2013.
- [88] S. Gateway, “Protein Molecular Weight Calculator.”
- [89] Alzet, “Mini - Osmotic Pump Model 2002,” 2008.
- [90] The Jackson Laboratory, “Body Weight Information for C57BL/6J (000664).”
- [91] V. Rodríguez, J. Lascani, J. A. Asenjo, and B. A. Andrews, “Production of Cell-Penetrating Peptides in *Escherichia coli* Using an Intein-Mediated System,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 175, no. 6, pp. 3025–3037, 2015.
- [92] Alibaba, “Jeulin Biorreactor 3 Ph Pco2 Equilibrio Curva Biorreactor 2000 L.”
- [93] Alibaba.com, “1000lph Water Filter Ultrafiltration Equipment With Hollow Fiber Membrane 0.01micron Uf Membrane.”
- [94] T. India, “Uip4000Hdt Industrial Ultrasonic Processor | SV SCIENTIFIC PRIVATE LIMITED.”
- [95] Alibaba, “Industrial Preperative Hplc System High Performance Liquid Chromatography .”
- [96] L. Scientz Alibaba, Guangzhou Labon Medical Equipment Co., “Equipo De Laboratorio Liofilizador.”

Anexo A

Análisis del tráfico del canal TRPM4

Para llevar a cabo la determinación de la distancia entre dos puntos se emplean 5 códigos que trabajan de manera coordinada. Los códigos se presentan en las siguientes secciones.

A.1. Código Matlab - Analisis.m

Este código Matlab permite llamar a los otros 4 códigos dependiendo de la necesidad. Primero abre la imagen a analizar, luego permite abrir un archivo de texto y agregar la información calculada respecto a la distancia en píxeles de los baricentros de cada zona seleccionada.

```
1 clear all
2 clc
3 S(1:2) = struct('Image', [], 'Label', ...
    ↪ ' ', 'ImageR', [], 'ImageG', [], 'ImageB', [], 'ImageRR', [], 'ImageGG', [], 'ImageBB', []);
4 for j = 1:length(S);
5     S(j).Image = imread(sprintf('image%1.0f.tif', j));
6     S(j).Label = 'image%1.0f.tif', j;
7     S(j).ImageR = S(j).Image(:, :, 1);
8     S(j).ImageG = S(j).Image(:, :, 2);
9     S(j).ImageB = S(j).Image(:, :, 3);
10
11     a = zeros(size(S(j).Image, 1), size(S(j).Image, 2));
12     S(j).ImageRR = cat(3, S(j).ImageR, a, a);
13     S(j).ImageGG = cat(3, a, S(j).ImageG, a);
14     S(j).ImageBB = cat(3, a, a, S(j).ImageB);
15 end
16 % Agrega la información recaudada en un documento txt
17 fileID = fopen(' textfile.txt ', 'a+');
18 fprintf ( fileID , '%10s \t %9s \t \t \t %15s \n', 'Imagen analizada', 'Tramo', 'Distancia ...
    ↪ pixeles');
19
20 for j = 1:length(S);
21     %Usuario dibuja el área de selección en la imagen roja
22     figure , imshow(S(j).ImageRR), title('Red channel')
23     [centroidR]=analyse(S(j).ImageRR);
```

```

24
25 %Usuario dibuja el área de selección en la imagen verde
26 figure , imshow(S(j).ImageGG), title('Red channel')
27 [centroidG]=analise(S(j).ImageGG);
28
29 %Usuario dibuja el área de selección en la imagen azul
30 figure , imshow(S(j).ImageBB), title('Red channel')
31 [centroidB]=analise(S(j).ImageBB);
32
33 %Determinación de distancia en pixeles
34 distRtoG=sqrt((centroidR(1)-centroidG(1))^2+(centroidR(2)-centroidG(2))^2);
35 distRtoB=sqrt((centroidR(1)-centroidB(1))^2+(centroidR(2)-centroidB(2))^2);
36 distGtoB=sqrt((centroidG(1)-centroidB(1))^2+(centroidG(2)-centroidB(2))^2);
37
38 fprintf ( fileID , '\t\t%d\t\t\t Distancia R-G\t\t\t %3.5f \n', j,distRtoG);
39 fprintf ( fileID , '\t\t%d\t\t\t Distancia R-B\t\t\t %3.5f \n', j, distRtoB);
40 fprintf ( fileID , '\t\t%d\t\t\t Distancia G-B\t\t\t %3.5f \n', j, distGtoB);
41 end
42 fclose ( fileID );

```

A.2. Código Matlab - Analise.m

Este código tiene el objetivo de entregar las herramientas para que el usuario pueda dibujar mediante el cursor el área que desea seleccionar.

```
1
2 function [centroid]= analise(c);
3     [mask,centroid] = DrawFreehandRegion(c); % Dibujar con el cursor un área irregular.
4
5     % Muestra la imagen.
6     maskedRImage = bsxfun(@times, c, cast(mask, class(c)));
7     imshow(maskedRImage);
8     fontSize = 14;
9     title('Selection', 'FontSize', fontSize);
10    reply2=preguntar();
11    if strcmpi(reply2, 'Other') %Usuario dibuja el área de selección en la imagen
12        [mask,centroid] = DrawFreehandRegion(c); % Dibujar con el cursor un área ...
13        ↪ irregular.
14        maskedRImage = bsxfun(@times, c, cast(mask, class(c)));
15        reply2=preguntar();
16        while strcmpi(reply2, 'Continue')~=1;
17            [mask,centroid] = DrawFreehandRegion(c); % Dibujar con el cursor un á...
18            ↪ rea irregular.
19            maskedRImage = bsxfun(@times, c, cast(mask, class(c)));
20            reply2=preguntar();
21        end
22    else
23        message = sprintf('We will continue with this selection ');
24    end
25    imshow(maskedRImage);
26    hold on
27    title('Selection', 'FontSize', fontSize);
28    plot(centroid(1), centroid(2), 'y+', 'MarkerSize', 30);
29
30 end
```

A.3. Código Matlab - DrawFreehandRegion.m

```
1
2 Gracias a los siguientes comandos es posible dibujar y seleccionar un área ...
   ↪ específica de la imagen usando el cursor.
3 function [mask,centroid] = DrawFreehandRegion(rgbImage)
4 try
5     fontSize = 14;
6     % Abre la ventana grande para facilitar el dibujo.
7     enlargeForDrawing = true;
8
9     imshow(rgbImage)
10    message = sprintf('Left click and hold to begin drawing.\nSimply lift the mouse ...
   ↪ button to finish');
11    text(10, 40, message, 'color', 'y', 'FontSize', fontSize);
12
13    uiwait(msgbox(message));
14
15    % Usuario dibuja el área a mano.
16    hFH = imfreehand();
17
18    % Se crea la imagen binaria.
19    mask = hFH.createMask();
20    xy = hFH.getPosition;
21
22    % Ocultar la imagen.
23    maskedRgbImage = bsxfun(@times, rgbImage, cast(mask,class(rgbImage)));
24
25    imshow(maskedRgbImage);
26
27    % Cerrar la figura maximizada.
28    measurements = regionprops(mask,'area', 'Centroid', 'Perimeter');
29    area = measurements.Area;
30    centroid = measurements.Centroid;
31    perimeter = measurements.Perimeter;
32
33    % Calcular el área en pixeles de la zona dibujada.
34    numberOfPixels1 = sum(mask(:));
35    % Otra forma de calcular que emplea fracciones de pixeles.
36    numberOfPixels2 = bwarea(mask);
37    %Coordenadas de la zona dibujada a mano.
38    structBoundaries = bwboundaries(mask);
39    xy=structBoundaries{1}; % Se obtiene un vector de n por 2 de las coordenadas x,y.
40    x = xy(:, 2); % Columnas
41    y = xy(:, 1); % Filas
42
43
44
45
```

```
46 catch ME
47     errorMessage = sprintf('Error running DrawFreehandRegion:\n\n\nThe error ...
    ↪ message is:\n%s', ...
48         ME.message);
49     WarnUser(errorMessage);
50 end
51 return;
52 end
```

A.4. Código Matlab - Preguntar al usuario.m

Este código le da al usuario la posibilidad de eliminar su selección y volver a hacerlo. De este modo, se puede realizar múltiples veces la selección del área sin arriesgarse a perder información.

```
1 function [reply2]=preguntar()
2 %Le pregunta al usuario si está contento con el área seleccionada o si desea ...
  ↪ volverlo a hacer
3 message = sprintf('Do you want to do a new selection? ,\nor just keep this one');
4 reply2 = questdlg(message, 'Choose an option', 'Other', 'Continue', 'Demo');
5
6 return
7 end
```

A.5. Código Matlab - Mensaje de precaución.m

En caso de generarse algún problema durante el uso del programa, este código emite un mensaje de precaución al usuario.

```
1 function WarnUser(warningMessage)
2     uiwait(warndlg(warningMessage));
3     return;
4 end
```

Anexo B

Tamaño de muestra y masa de péptido a producir para llevar a cabo el ensayo de tensión.

B.1. Ecuaciones empleadas

Para determinar el tamaño de la muestra se emplea la siguiente ecuación:

$$TM = \frac{2 \cdot (SD_{control}^2 + SD_{muestra}^2) \cdot (Z^{\alpha/2} + Z^{\beta})^2}{(M_{control} - M_{muestra})^2} \quad (B.1)$$

Donde,

TM = Corresponde al tamaño de la muestra.

$SD_{control}$ = Corresponde a la desviación estándar del grupo control [%].

$SD_{muestra}$ = Corresponde a la desviación estándar de la muestra [%].

Z = Corresponde a una distribución normal de media 1 y desviación estándar 1.

α = Corresponde al error tipo I.

β = Corresponde al error tipo II.

$M_{control}$ = Corresponde al valor promedio del control [%].

$M_{muestra}$ = Corresponde al valor promedio de la muestra [%].

Una vez determinado el tamaño de la muestra, se calcula la muestra real teniendo en cuenta la pérdida de muestras por manejo inadecuado de estas. Para ello se emplea la ecuación B.2.

$$TM_{real} = (1 + P) \cdot TM \quad (B.2)$$

Donde,

TM_{real} = Corresponde al tamaño de la muestra real a emplear.

P = Corresponde al porcentaje estimado de pérdida de muestra [%].

TM = Corresponde al tamaño de la muestra calculado con la ecuación B.1

Al determinar el tamaño de la muestra se puede calcular la masa de péptido a sintetizar.

Para ello se emplea la siguiente ecuación:

$$MP = \sum_{i=1}^4 N_i \cdot C_i \cdot V_i \cdot PM_{péptido} \quad (\text{B.3})$$

Donde,

MP = Corresponde a la masa de péptido a producir [g].

N_i = Corresponde al número de muestras a analizar para la condición i.

C_i = Corresponde a la concentración de péptido en la solución i a analizar [nM].

V = Corresponde al volumen de la solución para cada condición i [L].

$PM_{péptido}$ = Corresponde al peso molecular del péptido [Da].

B.2. Datos empleados

Para calcular la masa de péptido a sintetizar se emplean los siguientes datos obtenidos de investigaciones anteriores:

Tabla B.1: Datos empleados para el cálculo de la masa de péptido.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
$SD_{control}$	20	%	[52; 87]
$SD_{muestra}$	20	%	[52; 87]
α	0,05	-	-
β	0,2	-	-
$M_{control}$	100	%	[52; 87]
$M_{muestra}$	80	%	[52; 87]
Pérdida de muestra	20	%	-
C_1	5	nM	-
C_2	50	nM	-
C_3	250	nM	-
C_4	500	nM	-
Volumen solución	0,05	L	-
$PM_{péptido}$	4.889,78	g/mol	[88]

B.3. Memoria de cálculo

Al reemplazar los datos mostrados en la tabla B.1, se obtiene la siguiente expresión:

$$TM = \frac{2 \cdot (20\%^2 + 20\%^2) \cdot (Z^{0,05/2} + Z^{0,2})^2}{(100\% - 80\%)^2} \quad (\text{B.4})$$

Al buscar los valores en la tabla de distribución normal y reemplazarlos en la ecuación B.4,

se obtiene lo siguiente:

$$TM = \frac{2 \cdot (20 \%^2 + 20 \%^2) \cdot (1,96 + 0,842)^2}{(100 \% - 80 \%)^2} \quad (\text{B.5})$$

$$TM = 16 \quad (\text{B.6})$$

Resolviendo la ecuación anterior, se obtiene que el tamaño de la muestra para cada grupo es de 16 tejidos. Para determinar el numero real de tejidos que se deberán emplear se reemplaza el valor calculado anteriormente en la ecuación B.2 y se aproxima el resultado obtenido.

$$TM_{real} = (1 + 0,2) \cdot 16 \quad (\text{B.7})$$

$$TM_{real} = 20 \quad (\text{B.8})$$

De esta manera se obtiene que el numero de tejidos debe ser de 20 muestras por cada grupo y por cada condición de estudio ($N_i=20$). Reemplazando este valor y asumiendo que se deberá sintetizar el mismo volumen de solución para las tres condiciones ($V_{1,2,3,4}=V=0,05$ [L]), se obtiene la siguiente expresión:

$$MP = 20 [muestras] \cdot 0,05 [L] \cdot 4.889,78 [g/mol] \cdot \sum_{i=1}^4 C_i \quad (\text{B.9})$$

$$MP = 4 [mg] \quad (\text{B.10})$$

Anexo C

Masa de péptido a producir para llevar a cabo el estudio de seguridad

Este estudio, como se indica en la metodología, corresponde a la administración de péptido a los animales en estudio (en este caso ratones) de forma constante mediante una bomba osmótica la cual posee una velocidad de liberación de sustrato constante. Específicamente, para determinar la masa de péptido requerida para este análisis, es necesario determinar el volumen de almacenamiento de la bomba osmótica y la concentración de péptido en la solución a inyectar.

Una vez determinada la concentración de péptido SWIP y el volumen de solución, y multiplicando por la masa molecular del péptido es posible determinar la masa de péptido necesaria para abastecer un ratón.

Finalmente, para determinar los gramos de proteína necesarios se debe multiplicar el valor obtenido anteriormente, por el número de ratones totales a estudiar.

C.1. Ecuaciones empleadas

Para determinar la masa de péptido a sintetizar, es necesario calcular el volumen por bomba osmótica y la concentración de la solución. Para calcular el volumen a producir es necesario determinar el volumen de solución a inyectar por el periodo de estudio.

$$V_{SWIP} = T_{liberación} \cdot t_E \quad (C.1)$$

Donde,

V_{SWIP} = Corresponde al volumen de solución por ratón [μL].

$T_{liberación}$ = Tasa de liberación bomba osmótica [$\mu\text{L}/\text{h}$].

t_E = Duración del estudio.

Una vez determinado el volumen de solución por animal, es necesario calcular la concentración del péptido. Para ello se emplea la ecuación C.2.

$$C_{SWIP} = \frac{T_{SWIP} \cdot MR}{T_{liberación}} \quad (C.2)$$

Donde,

C_{SWIP} = Corresponde a la concentración de la solución [mM].

T_{SWIP} = Corresponde a la velocidad de infusión de péptido por masa de ratón [nM/h·kg].

MR = Corresponde al peso promedio de un ratón [g].

$T_{liberación}$ = Tasa de liberación bomba osmótica [μ L/h].

Al determinar el volumen de solución por ratón y la concentración de esta, se puede calcular los gramos a sintetizar de péptido SWIP por ratón. Para ello se emplea la siguiente fórmula:

$$MP = C_{SWIP} \cdot V_{SWIP} \cdot PM_{péptido} \quad (C.3)$$

Donde,

MP = Corresponde a la masa de péptido a producir [g].

C_{SWIP} = Corresponde a la concentración de la solución calculada anteriormente C.2 [mM].

V_{SWIP} = Corresponde al volumen de solución por ratón calculado en C.1 [μ L] .

$PM_{péptido}$ = Corresponde al peso molecular del péptido [Da].

C.2. Datos empleados

Para calcular la masa de péptido a sintetizar se emplean los siguientes datos obtenidos de investigaciones anteriores:

Tabla C.1: Datos empleados para determinar masa de SWIP a utilizar en estudio de seguridad.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
$T_{liberación}$	0,5	$\mu\text{L}/\text{h}$	[89]
tiempo de estudio (t_E)	504	h	-
T_{SWIP}	276	$\text{nM}/\text{h}\cdot\text{kg}$	-
Masa ratón promedio (MR)	25	g	[90]
$PM_{péptido}$	4.889,78	g/mol	[88]
Nº animales a estudiar	56	-	

C.3. Memoria de cálculo

Al reemplazar los datos indicados en la tabla C.1 en la ecuación C.1 se obtiene la siguiente expresión:

$$V_{SWIP} = 0,5 [\mu\text{L}/\text{h}] \cdot 504 [\text{h}] \quad (\text{C.4})$$

$$V_{SWIP} = 252 [\mu\text{L}]. \quad (\text{C.5})$$

Para determinar la concentración de la solución a introducir se utilizan los datos mencionados en la tabla C.1 y la ecuación C.2. Al reemplazar los datos se obtiene lo siguiente:

$$C_{SWIP} = \frac{276 [\text{nM}/\text{h} \cdot \text{kg}] \cdot 0,025 [\text{kg}]}{0,5 [\mu\text{L}/\text{h}]} \quad (\text{C.6})$$

$$C_{SWIP} = 14 \text{ mM} \quad (\text{C.7})$$

Empleando los valores calculados anteriormente, es posible determinar la masa necesaria por ratón para el estudio de seguridad.

$$MP = 14 [\text{mM}] \cdot 252 [\mu\text{L}] \cdot 4.889,78 [\text{g}/\text{mol}] \quad (\text{C.8})$$

$$MP = 17,26 [\text{mg}] \quad (\text{C.9})$$

Al multiplicar el valor anterior por el número de ratones a estudiar, correspondiente a 56 animales, se obtiene que la masa de péptido total a sintetizar para el estudio de seguridad es de 966,56 [mg].

Anexo D

Calculo del volumen de cultivo

D.1. Ecuación empleada

$$V_{cultivo} = \frac{MP}{Rendimiento} \quad (D.1)$$

Donde,

MP = Corresponde a la masa de péptido a producir [g].

Rendimiento = Corresponde a la masa de péptido producido por volumen de cultivo [g/L].

D.2. Datos empleados

Tabla D.1: Datos empleados para el cálculo del volumen de cultivo.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Masa de péptido (estudio de tensión)	0,004	g	Calculado en B.10
Masa de péptido (estudio de seguridad)	0,967	g	Calculado en C.9
Rendimiento	$0,65 \cdot 10^{-3}$	g/L	[91]

D.3. Memoria de cálculo

Al reemplazar los datos indicados en la tabla D.1 en la ecuación D.1, y aproximando la masa de péptido a producir desde 0,971 gramos a 1 gramo y empleando el rendimiento de gramos de proteína recombinante por litro de cultivo presentado anteriormente, se obtiene la siguiente expresión:

$$V_{cultivo} = \frac{1 [g]}{0,65 \cdot 10^{-3} [g/L]} \quad (D.2)$$

$$V_{cultivo} = 1,54 m^3 \quad (D.3)$$

Anexo E

Costos de inversión

Con el fin de calcular el costo de producción del fármaco, se buscan los valores de los equipos requeridos para la síntesis, separación, purificación y tratamiento del péptido. De esta forma se determina que el costo de inversión corresponde a 84.500 dólares. Los precios cotizados se presentan a continuación.

Tabla E.1: Datos análisis económico fermentación.

Equipo	Capacidad	Costo [USD]	Referencia
Bioreactor	3000 L	29.000	[92]
Filtración	1000 L/h	2.500	[93]
Sonicador	800 L/h	30.000	[94]
HPLC	600 L/h	19.500	[95]
Liofilización	2 kg	3.500	[96]

Anexo F

Producción química péptido SWIP

Para comparar los costos asociados a la producción recombinante con el costo de la producción química del péptido se cotizo el precio de compra de 1 gramo de péptido en dos empresas de renombre internacional.

Al solicitar la producción de 1 gramo de péptido con una pureza mayor al 95 %, se que el costo en ambas empresas bordea a los 6.000 dolares. Específicamente, el valor de la compra es de 6.159 dolares en Biomatik y 5.820 en GenScript. Las cotizaciones realizadas en ambas empresas se presentan a en las siguientes figuras.

Product Description	Qty	Unit Price	Line Total
#SP0002, Custom Peptide Synthesis - psd Peptide # 1 Peptide Name: SWIP (40) Sequence: YGRKKRRQRRRMVVPEKEQSWIPKIFKKKTCYPYDVPDYA Gross Weight: 1g Purity: >99% TFA Removal: Not Required Solubility Test (Free of Charge): Required	1	8,112.00	8,112.00
QC Data: CoA, MS spectra, HPLC chromatograms. Estimated Turnaround Time: 4-5 weeks			
Best Price Guarantee: We will match or beat any reputable competitor's prices by 5%. How to Order? Order with PO#, email or fax us your purchase order; Order with credit card, please fax us your credit card authorization form or click Quote-to-Order			
	Subtotal		8,112.00
	Discount		-2,028.00
	Sales Tax		0.00
	S & H		75.00
	TOTAL		USD 6,159.00

Figura F.1: Cotización asociada a la producción química de péptido SWIP en Biomatik.

Quotation Details

Quote No.	Currency	Estimated Turnaround Time	Terms	Incoterm	Ship Via
U2259FI030	United States Dollar (\$)	23-28 business day(s)	Net 30	FOB/FCA	FedEx International Export Priority
Item No	Quantity	Description	Shippable	Unit Price	Amount
1	1	SC1208 Chemical Peptide Synthesis:peptide Weight: Gross Quantity: 1000 mg Purity: ≥95% Length: 40 Aliquoting To: 1(vials) Delivery Format: Lyophilized Sequence: YGRKRRRQRRRMVVPEKEQSWIPKIFKKKTCYPYDVP DYA	Y	\$5,820.00	\$5,820.00
2	1	SC1634:AccuPep- Solubility Test:peptide Solubility Test: Ultrapure water,1 × DPBS(pH 7.1±0.1),DMSO	N	\$0.00	\$0.00
Subtotal(United States Dollar)					\$5,820.00
Estimated Shipping(United States Dollar)					\$61.11
Estimated Handling(United States Dollar)					\$11.00
Taxes					\$0.00
Total Amount(United States Dollar)					\$5,892.11

Figura F.2: Cotización asociada a la producción química de péptido SWIP en GenScript.

Anexo G

Protocolo enviado al Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)



UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ INSTITUCIONAL de CUIDADO y USO de ANIMALES (CICUA)

PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES
(Debe ser presentado en español)

Uso interno

Investigador:
Código Comité Facultad:
Código CICUA:
Evaluadores:
Fecha de recepción:
Fecha certificación:

A. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

A.1. Título del proyecto presentado:

“Efecto de un péptido inhibidor del canal TRPM4 sobre la contractilidad de músculo detrusor de vejiga”

Fecha de inicio y término del proyecto (indique mes y año):

Inicio: Mayo 2020
Término: Abril 2021

Fecha de inicio y término de uso de los animales (indique mes y año):

Inicio: Mayo 2020
Término: Abril 2021

A.2. Tipo de proyecto y actividad (marque con una cruz, si es Tesis indique de que Programa)

INVESTIGACIÓN: **DOCENCIA:** **TESIS: X** **OTRO:**

Fernanda Soto, Tesis de Pregrado Ingeniería Civil Química e Ingeniería Civil en Biotecnología de la Universidad de Chile

Fuente Financiamiento y vigencia (Nombre y n°):

- Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (MiNICAD, 2018-2021).

A.3. Nombre del Investigador Responsable y nombramiento institucional (cargo):

Académico Responsable: Dr. Óscar Cerda Arancibia

Jerarquía Académica: Profesor Asociado

Facultad o Instituto: Facultad de Medicina – Instituto de Ciencias Biomédicas.

Departamento: Programa de Biología Molecular y Celular.

Nombre Patrocinado, si existiese (Investigador externo, Postdoctorante, Tesista):

Tesista: Fernanda Soto Montandon (Tesista de Pregrado Ingeniería Civil Química e Ingeniería Civil en Biotecnología de la Universidad de Chile)

A.4. Teléfono(s) de contacto:

Óscar Cerda Arancibia: (2) 2978 86909 (oficina), +56 9 6687 8768 (celular) **Fax:**
e-mail: oscarcerda@uchile.cl

Rodrigo Alzamora Miranda (2) 2978 89533 (oficina), +56 9 964 59992 (celular) **Fax:**
e-mail: alzamorar@uchile.cl, alzamorar@gmail.com

A.5. Mencione el Laboratorio y Departamento de la Facultad en la que se desarrollará el trabajo con animales (si el trabajo lo realizará en más de un Laboratorio o Unidad debe especificarlo)

Laboratorio de Fisiología Renal, Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina: Pabellón B – Primer Piso.

Programa de Biología Molecular y Celular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina: Pabellón E – Zócalo.

A.6. Contacto en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral (al menos 2 personas).

Nombre: Raquel Pinto (Veterinaria)

Teléfono: +56 9 7877 1765

Nombre: Rodrigo Alzamora Miranda

Teléfono: +56 9 9645 9992

A.7. Listado de personas autorizadas para el manejo de los animales. Indique su capacitación (técnico, bioterista, tesista, postdoctorante, investigador, académico, etc.) y la función directa que realizará en el manejo de los animales (ej. Aseo, inoculación de animales, cirugías, etc) y vínculo con el Laboratorio. Incorpore las filas que sean necesarias. NO OLVIDE que debe comunicar oportunamente si se produce un cambio en el listado presentado a continuación (agregue cuantas filas sean necesarias).

NOMBRE	CAPACITACIÓN	FUNCIÓN en el Proyecto	FILIACIÓN Institucional	VÍNCULO con la Unidad
Rodrigo Alzamora Miranda	Bioquímico, Doctor en Fisiología.	Supervisión	Profesor Asistente	Investigador Principal
Raquel Pinto	Médico Veterinario	Anestesia Eutanasia	Asistente de Investigación	Médico Veterinario
Oscar Cerda Arancibia	Ing. Biotecnología Molecular, Doctor en Cs Biomédicas.	Supervisión	Profesor Asociado	Investigador Principal

B. ANTECEDENTES DE LOS ANIMALES A UTILIZAR

B.1. Especie(s), raza, cepa, y línea transgénica (si aplica) utilizada(s):

Ratones C57BL/6 (*Mus musculus*).

B.2. Edad/Estado de desarrollo:

10-14 semanas.

B.3. Peso:

25-30 gramos.

B.4. Sexo:

Masculino.

Justificación: Para este estudio solo se utilizarán ratones machos debido a que diversos estudios han demostrado que existen diferencias significativas en la fisiología de la vejiga (Patra PB, Patra S, 2012). Existen diferencias significativas en la respuesta contráctil del músculo detrusor de la vejiga a sustancias colinérgicas tales como acetilcolina o carbacol (Longhurst PA, Levendusky M, 2000). Este fenómeno se debería a diferencias en los niveles de expresión de receptores muscarínicos en el músculo detrusor de vejiga. La expresión de los

receptores muscarínicos M1 y M3 es menor en hembras en comparación a los machos que expresan más receptores M2 y M5 (Sigala S *et al*, 2002). Dado que el estudio a realizar requiere medir el efecto de un fármaco inhibidor del canal iónico TRPM4 sobre la respuesta contractil del músculo detrusor de la vejiga al ser estimulado con acetilcolina hemos decidido solo usar animales de este sexo.

Patra PB, Patra S. (2012) Sex differences in the physiology and pharmacology of the lower urinary tract. *Curr Urol* 6:179-88.

Longhurst PA, Levendusky M. (2000) Influence of gender and the oestrous cycle on in vitro contractile responses of the rat urinary bladder to cholinergic stimulation. *Br J Pharmacol* 131:177-84.

Sigala S, Mirabella G, Peroni A, Pezzotti G, Simeone C, Spano PF, Cunico SC. (2002) Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology* 60:719-25.

B.5. Indique el origen de los animales (lugar de procedencia)

Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

B.6. Indique el lugar donde se realizarán los procedimientos y la superficie disponible para que los animales vivos permanezcan (ya sea en el bioterio o fuera de él):

Lugar de procedimientos: Sala de Procedimientos, Lab. de Fisiología Integrativa (Pabellón B, Primer Piso). No se realizará mantención de animales, solo eutanasia. La sala tiene un área de aproximadamente 16 m², se encuentra aislada con su propia entrada y con acceso restringido a personal autorizado. La sala posee un sistema de ventilación independiente con filtros HEPA que permiten la extracción de gases como isoflurano. La sala posee un área limpia para disección y está equipada con máquina de anestesia y lupas de disección. La obtención de certificación por el CBA se encuentra en trámite por el Dr. Luis Michea que es el académico a cargo.

B.7. Señale el número total de animales a utilizar en el proyecto (Señale además si se compartirán animales con otro proyecto. El desglose por objetivos se debe incluir en la sección C.4):

30 animales (no compartidos).

B.8. Señale el método(s) de identificación de los animales.

Los animales se mantendrán en jaulas individuales identificadas debidamente según el grupo experimental al que pertenezcan.

B.9. Describa detalladamente las condiciones de traslado de los animales y la(s) persona(s) responsable(s)

del traslado.

Los ratones serán transportados desde el lugar de obtención (Bioterio Central Facultad de Medicina) en jaulas de policarbonato (Nalgene) con cama de mazorca de maíz. La distancia de traslado será menor a 500 metros con un tiempo de traslado inferior a los 15 minutos. Los animales serán transportados por las personas señaladas anteriormente, manteniendo condiciones adecuadas para la movilización de los animales, hasta llegar al lugar de experimentación, donde se tendrán en condiciones adecuadas para la mantención y uso de animales de laboratorio (NIH Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Los animales serán usados inmediatamente para la extracción de las vejigas.

B.10. Si procede, remita el certificado de SAG o institución que autoriza el uso (en caso de animales silvestres).

No Aplica.

C. PROPÓSITOS DE LA INVESTIGACIÓN**C.1. Señale el o los propósito(s) principal(es) del Proyecto en un párrafo no superior a 12 líneas. Éstos deben ser explicados de manera que sean comprensibles para el ciudadano común. Además, la relevancia del proyecto debe quedar claramente señalada para cualquier evaluador éticista.**

La incontinencia urinaria es la pérdida del control de la vejiga. Los síntomas pueden variar desde una filtración de orina leve hasta la salida abundante e incontrolable de ésta. La mayoría de los problemas de control de la vejiga ocurren cuando los músculos están demasiado débiles o demasiado activos. Si los músculos de la vejiga están demasiado activos, es posible que sienta una fuerte urgencia por ir al baño cuando tenga poca orina en la vejiga. Esto se conoce como incontinencia de urgencia o vejiga hiperactiva. Existen otras causas de incontinencia, tales como problemas con la próstata y lesiones neurológicas. El tratamiento depende del tipo de problema que tenga el paciente y puede incluir ejercicios simples, medicinas, el uso de dispositivos especiales o procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, en muchos casos ninguno de estos tratamientos produce resultados satisfactorios. Debido a esto es de interés el desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de esta condición. Este proyecto busca evaluar la efectividad de un nuevo fármaco para reducir la actividad contráctil del músculo de la vejiga. Para ello, se extraerán las vejigas de ratones y segmentos de músculo serán tratados in vitro con el fármaco para determinar su efecto.

C.2. Justifique el uso de ANIMALES, en vez de usar modelos alternativos. Por modelos alternativos se entienden aquellos que reemplacen la utilización de animales vertebrados. Indique los motivos por los cuales no se plantea aplicar un método alternativo al procedimiento propuesto.

El estudio de los mecanismos que controlan la capacidad contráctil de la vejiga requiere del uso del tejido completo. No existen líneas celulares de músculo liso de vejiga adecuadas para el estudio de contractilidad. Debido a esto, para realizar un estudio farmacológico adecuado, se requiere del tejido muscular de vejiga. El ratón es un modelo ampliamente usado y aceptado para el estudio de la función contráctil del músculo detrusor.

C.3. Explique las características que justifiquen el uso de esta(s) ESPECIE(s).**Indique la especie y raza (o cepa) que se propone utilizar y los motivos de esta selección.**

El ratón (*Mus musculus*, C57BL/6) es un animal que presenta una fisiología de alta similitud con la humana, usado ampliamente en la literatura para el estudio de la fisiopatología de la incontinencia urinaria (1, 2). Además, nuestro laboratorio tiene experiencia en el uso de tejidos de ratones para las mediciones que se realizarán (3).

Kullmann FA, Daugherty SL, de Groat WC, Birder LA. (2014) Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology. *J Vis Exp* 90:e51807.

Kullmann FA, Beckel JM, McDonnell B, Gauthier C, Lynn AM, Wolf-Johnston A, Kanai A, Zabbarova IV, Ikeda Y, de Groat WC, Birder LA. (2018) Involvement of TRPM4 in detrusor overactivity following spinal cord transection in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 391(11):1191-1202.

Ocaranza MP, Moya J, Barrientos V, Alzamora R, Hevia D, Morales C, Pinto M, Escudero N, García L, Novoa U, Ayala P, Díaz-Araya G, Godoy I, Chiong M, Lavandero S, Jalil JE, Michea L. (2014) Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens* 32(4):771-83.

C.4. Justifique estadística y/o bibliográficamente el número de animales a utilizar por cada uno de los objetivos del estudio. Recuerde que de acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, se debe utilizar el mínimo de animales necesario para obtener resultados válidos Aplicar el principio de las 3 Rs: Reemplazar animales por otro sistema (ej. in vitro); Reducir número de animales; Refinar los procedimientos realizados.

El número de animales a usar fue determinado para el desarrollo del total de los experimentos, descritos a continuación. Para el cálculo de tamaño de muestra se asumirá como diferencia estadísticamente significativa un cambio de al menos 20% respecto al grupo control, con una desviación estándar del 10% de la media poblacional, y una pérdida de 10% de las muestras. Para ello, requeriremos un mínimo de 5 ratones en cada grupo experimental. Para los experimentos se usarán 6 grupos experimentales (control + 5 dosis distintas de fármaco) para un total de 30 animales.

Para el análisis de 2 grupos con variables continuas se empleará prueba *t* de Student para muestras pareadas. Para el análisis de más de 2 grupos, se empleará prueba de ANOVA con análisis *post-hoc* de Bonferroni. Las variables continuas se expresarán como media aritmética \pm error estándar. Todos los análisis serán hechos de 2 colas. Se definirá como diferencia estadísticamente significativa un valor *P* menor al 5% ($P < 0,05$).

D. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO

D.1. Enumere la secuencia de TODOS los procedimientos a seguir con los animales. Explícite el curso temporal en los procedimientos crónicos. El detalle de procedimientos no quirúrgicos (manipulación y administración de sustancias) debe incluirse en la Sección E. El detalle de los procedimientos quirúrgicos debe incluirse en la Sección F.

Para el estudio a realizar se extraerán las vejigas de ratones C57BL/6 machos. La eutanasia se realizará mediante sobredosis de anestesia con isoflurano (5%). Las vejigas serán disecadas libres de tejido adiposo y adventicia. Segmentos longitudinales de 1 x 6 mm serán usados para cultivos organotrópicos durante 48 horas.

D.2. Describa el o los criterios de interrupción del trabajo con los animales durante el experimento. Incluya en su descripción el procedimiento esperado de finalización y las circunstancias en que el experimento será interrumpido para evitar sufrimientos innecesarios al animal. Si su protocolo incluye experimentos crónicos con inducción de patologías, indique explícitamente en qué momento se eutanasiarán los animales y el grado de compromiso de bienestar general, que se espera en esas condiciones, en base a los protocolos de supervisión modificados de Morton y Griffiths (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985) según corresponda, establecidos en los Anexos II y III. Puede modificarlo según las condiciones del estudio y las características de su modelo animal.

Los animales solo serán usados para la extracción de tejido de vejiga.

E. PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS (MANIPULACIÓN DEL ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS)

E.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) no quirúrgico(s) a realizar. Incluya en su descripción: administración de sustancias, vía, sitio de inoculación, forma de administración, volumen y frecuencia de administración, métodos de sujeción o inmovilización del animal, uso de radiación (dosis y frecuencia), otros procedimientos: estudios de supervivencia, biopsias, entre otros.

Eutanasia: eutanasia farmacológica mediante la administración de una sobredosis de isoflurano (5%). Se confirmará la muerte del animal por ausencia de latidos cardiacos y movimientos respiratorios.

E.2. Indique el nombre y experiencia de la(s) personas que efectuará(n) los procedimientos no quirúrgicos.

Dr. Rodrigo Alzamora (Bioquímico y Doctor): Experiencia en manimulación y cuidados de roedores.

Raquel Pinto (Médico Veterinario): Experiencia en manimulación y cuidados de roedores.

E.3. Indique las condiciones en que se mantendrán los animales en los periodos de tiempo entre las distintas intervenciones.

Los animales solo serán usados para la extracción de tejido de vejiga.

F. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

F.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) a realizar. Incluya métodos de asepsia que utilizará.

No se realizarán procedimientos quirúrgicos que requieran la sobrevivencia del animal.

F.2. Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) procedimientos quirúrgicos.

Raquel Pinto (Médico Veterinario): Experiencia en manimulación y cuidados de roedores.

F.3. Condiciones e infraestructura del lugar donde se efectuarán los procedimientos quirúrgicos.

El procedimiento quirúrgico se realizará en la zona estéril de la sala de Cirugía del Laboratorio de Fisiología Integrativa. Esta instalación cumple con los requisitos señalados en el Manual de Bioseguridad CONICYT. Máquina de anestesia, lupa de disección.

F.4. Si el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) incluyen supervivencia del animal, señale el cuidado postoperatorio requerido e identifique a la persona responsable.

No Aplica.

F.5. Si corresponde justifique si un mismo animal será sometido a procedimientos quirúrgicos más de una vez e indique el procedimiento previo.

No Aplica.

G. DOLOR Y AFLICCIÓN

Es imperativo observar el principio fundamental de **evitar todo dolor y sufrimiento innecesario en cada animal que participa en un estudio científico**. Toda manipulación que provoque dolor o aflicción del o de los animal(es), **debe justificarse** en forma sólida y detallada.

G.1. Indique en la siguiente Tabla, el nivel de dolor según el grado de estrés o discomfort producido en los animales a manipular cada año. Los diferentes niveles de dolor o aflicción en el manejo de animales se explican en el Anexo IV. * Es obligatorio completar esta Tabla.

Nivel de Dolor	Indique Número de Animales por Año				
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
A. Mínimo dolor y estrés	30				
B. Dolor asistido por medidas apropiadas (analgésico u otro)					
C. Dolor no asistido por medidas apropiadas					

G.2. Anestesia, Analgesia y Tranquilizantes. Para los animales indicados en la Tabla anterior (G1), categorías B, especifique los anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes que serán utilizados. Indique el o los nombre(s) de(los) agente(s) usado(s), la dosis, ruta, frecuencia y duración de administración, así como la(s) persona(s) encargada(s) del tratamiento y supervisar su efecto.

Se realizará eutanasia farmacológica mediante la administración de una sobredosis de isoflurano (5%). Se confirmará la muerte de animal por ausencia de latidos cardiacos y movimientos respiratorios. Estos procedimientos serán realizados por: Rodrigo Alzamora y Raquel Pinto.

G.3. Si hay animales indicados en la categoría C de la Tabla G.1., se debe justificar por qué está contraindicado el uso de anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes durante, o después de los procedimientos que causan dolor o aflicción (incluya referencias).

No Aplica.

H. DISPOSICIÓN FINAL DE LOS ANIMALES

H.1. Eutanasia. Describa detalladamente el método de eutanasia. Si se usa un agente químico, especifique, dosis y ruta de administración. Si su método es físico o mecánico, describa y justifique el método a utilizar. Indique la(s) persona(s) encargada(s) de esta función (Se sugiere revisar *The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association, USA*).

El procedimiento de eutanasia se realizará bajo anestesia por isofluorano (Forane®, Abbott). Para la inducción, los animales serán puestos en una cámara de inducción (15 cm ancho x 10 cm alto x 15 cm profundidad, 2,2 L de volumen) provista de *inlet* y *oulet* para el flujo continuo del isofluorano. El isofluorano será administrado a una concentración del 5% usando una máquina de anestesia clínica. Una vez inducidos, los animales serán mantenidos con isofluorano a una concentración del 1-2% administrado a través de una máscara de anestesia. El efecto del isofluorano se evaluará usando la respuesta refleja al aplicar presión en una pata usando un fórceps. La eutanasia se realizará mediante dislocación cervical, la muerte de animal se confirmará por ausencia de latidos cardiacos y movimientos respiratorios. La disección de la vejiga se realizará usando material quirúrgico esterilizado por autoclave. Estos procedimientos serán realizados por Raquel Pinto (Veterinaria).

H.2. Eliminación de desechos. Describa brevemente el proceso de eliminación de los cadáveres de acuerdo con las normas de Bioseguridad de su Unidad. Si la eliminación es diferente a lo establecido, debe explicar el procedimiento en detalle y justificarlo.

Los desechos serán eliminados de acuerdo a las normas de Bioseguridad de la Facultad de Medicina. Los cadáveres se almacenarán en un freezer destinado a este uso en bolsas plásticas selladas y debidamente etiquetadas para su posterior eliminación.

H.3. Mantenimiento de especímenes muertos. Describa la finalidad y las normas establecidas en cada caso (conservación en museos, docencia, otros).

No Aplica.

H.4. Supervivencia. Describa y justifique la disposición y destino de los animales en caso de experimentos o actividades docentes en que los animales no son eutanasiados al término del procedimiento.

No Aplica.

I. SUBSTANCIAS ADMINISTRADAS A LOS ANIMALES QUE REQUIERAN CERTIFICACIÓN ESPECIAL

I.1. El uso de fármacos o sustancias peligrosas en la investigación con animales requiere de una aprobación separada. Es su responsabilidad contar con la(s) autorización(es) correspondiente(s). Si es relevante, adjunte las autorizaciones a este documento.

Nota: Si en su proyecto considera la utilización de agentes psicotrópicos, debe llevar un control y registro del uso de éstos. Además, todo excedente deberá ser comunicado a Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de su unidad para su resguardo o eliminación.

Señale a continuación en las siguientes Tablas aquellas sustancias que utilizará.

SUSTANCIAS QUE NO REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias
Agentes Biológicos	No Aplica
Fármacos	No Aplica
Otros	No Aplica

SUSTANCIAS DAÑINAS PARA LOS ANIMALES O HUMANOS QUE REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias y documentación, si corresponde
Radionúclidos	No Aplica
Agentes Biológicos	No Aplica
Drogas o químicos peligrosos	No Aplica
ADN Recombinante	No Aplica
Fármacos	No Aplica
Otros	No Aplica

J. CERTIFICACIONES DEL ACADÉMICO Y/O INVESTIGADOR RESPONSABLE DE LOS PROCEDIMIENTOS DESCRITOS EN ESTE PROTOCOLO

- J.1. Certifico** que, a mi juicio, la investigación propuesta no constituye una duplicación innecesaria de investigaciones previas.
- J.2. Certifico** que todas las personas bajo mi supervisión y responsabilidad que participan en los procedimientos con los animales, trabajarán de acuerdo con las normas y reglas éticas vigentes nacionales e internacionales.
- J.3. Certifico** que he revisado la literatura científica y base de datos pertinentes sin encontrar procedimientos válidos alternativos, o no estoy en condiciones de desarrollarlos.
- J.4. Confirmo** que he completado la Tabla en el ítem G.1
- J.5. Certifico** que los antecedentes presentados en este Protocolo **incluyen la totalidad** de los procedimientos con animales propuestos en el Proyecto.
- J.6.** Me comprometo a solicitar y obtener la aprobación del CICUA de la Universidad de Chile antes de iniciar **CUALQUIER** cambio al Protocolo aprobado, **sea de procedimientos** como de **personal**.
- J.7. Certifico** que el personal que estará a cargo del manejo y o manipulación de los animales cuenta con experiencia, certificación o algún tipo de calificación que evite exponer a los animales a situaciones que ponen en riesgo su bienestar.
- J.8. Declaro** estar en conocimiento que se realizará **SEGUIMIENTO** por parte del CICUA para confirmar el cumplimiento de este Protocolo.
- J.9. Certifico** que las personas involucradas en este protocolo han leído y aprobado la versión definitiva de este documento.

J.10. Investigador Patrocinado del protocolo (si lo hubiese):

Firma:

J.11. Académico Responsable del Protocolo y los procedimientos planteados:

Firma:

J.12. VºBº Director de la Unidad Académica:

Firma:

(Importante: las firmas en los puntos J.10, J.11 y J.12 deben ir sólo en el protocolo final aprobado, no son necesarias ni en la primera presentación digital, ni en las enmiendas posteriores a la certificación si las hubiere)

Fecha envío del protocolo:

Check List

Señor Académico: Con el fin de evitar rechazo por parte del CICUA de su Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio por razones formales, por favor verifique que:

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 Cuenta con las respectivas firmas del Investigador, Director de la unidad y Académico responsable de los procedimientos (éste último si corresponde según el punto M) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 2 Respondió el B.5 y B.6 (indicar bioterio y lugar de los procedimientos con los animales) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 3 Ha especificado el cálculo del número total de animales a utilizar (punto B.7) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 4 Se ajustó a las indicaciones del punto C.1 (descripción breve y comprensible para el ciudadano común de los propósitos de la investigación). | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 5 Ha justificado y especificado el cálculo del número de animales a utilizar por objetivo (punto C.4) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 6 Indicó “ no aplica “ en todos los items en que no corresponde responder | <input checked="" type="checkbox"/> |

ANEXO I - GLOSARIO

Afflicción: dolor o molestia.

Analgésico: fármaco utilizado para reducir la percepción central de los estímulos dolorosos.

Anestésico: fármaco que bloquean la sensibilidad táctil y dolorosa de un individuo generando un estado de inconsciencia en el animal. Puede utilizarse de manera parcial sobre el cuerpo (local) o general. Se caracteriza por generar analgesia, amnesia, e inmovilidad. Se utiliza en procedimientos quirúrgicos, en procedimientos poco invasivos pero muy dolorosos, y también para la exploración física o toma de muestras.

Angustia: emoción negativa, se caracteriza por ser una emoción compleja, puede ocurrir sin presencia del estímulo.

Criterio de punto final: Punto determinado de manera científica, donde el dolor o distrés del animal es terminado, minimizado o reducido a través de acciones a través de la eutanasia, tratamiento o terminando el procedimiento.

Criterio de interrupción: Punto en el cual se decide poner término de manera anticipada a la investigación, ya sea porque el análisis preliminar de resultados lo permite o porque hay problemas metodológicos que así lo requieren.

Discomfort: situación no confortable, que causa incomodidad en el animal.

Distrés: se refiere al contenido emocional de experiencias nocivas que provocan una respuesta de estrés fisiológico en los animales. La experiencia nociva puede ser predominantemente emocional, física, o una combinación de ambos. Generalmente ocurre cuando la respuesta de estrés es muy aguda o cuando se hace crónica, sobrepasando la capacidad de adaptación del individuo.

Dolor: experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño. Para cuantificarlo se utilizan signos indirectos de dolor, como por ejemplo expresión facial, cambios posturales y conductuales. Siempre que exista el riesgo de que se produzca dolor se debe usar un analgésico. Si no existe evidencia científica de que el procedimiento cause dolor, se asume que si es doloroso para el humano lo es para el animal.

Estrés: Se refiere al amplio rango de respuestas fisiológicas y conductuales aun cierto estímulo, desde las pequeñas desviaciones de los ajustes homeostáticos diarios que se dan bajo circunstancias benignas, hasta los cambios fisiológicos máximos de los sistemas del individuo.

Eutanasia: Del griego eu (bueno) y thanatos (muerte). Describe el término de la vida de un individuo de una forma que minimice o elimine el dolor y distrés. Es deber del Médico Veterinario llevar a cabo la eutanasia a través de criterios acordes a los intereses del animal y/o debido a principios de bienestar animal. Deben utilizarse técnicas que induzcan la muerte de una forma rápida, sin dolor ni distrés (AVMA, 2013).

Modelos alternativos: aquellos que reemplazan la utilización de animales vertebrados.

Principio de las 3 Rs: principio formulado en la década de los 60 por los biólogos ingleses, Russel y Burch, en su libro "The Principle of Humane Experimental Technique". Hacen referencia a Reemplazar, Reducir y Refinar.

Reemplazo: Preferir el uso de modelos no-animales sobre modelos animales cuando sea posible y permitan alcanzar los objetivos científicos (modelos virtuales, métodos in vitro). Otra alternativa es utilizar animales que estén más abajo en la escala filogenética (reemplazo relativo) que tienen menor capacidad de experimentar sufrimiento (ej. Reemplazar modelo vertebrado por invertebrado).

Reducción: Utilizar métodos que permitan obtener niveles de información comparables reduciendo al máximo la cantidad de animales utilizados, u obtener mayor información desde el mismo número. Estos métodos incluyen diseños experimentales apropiados, determinación de tamaño muestral, y análisis estadístico apropiado.

Refinamiento: Utilizar métodos que alivien o minimicen el potencial dolor, sufrimiento o distrés, aumentando el bienestar animal desde su nacimiento hasta su muerte, por ejemplo a través del enriquecimiento ambiental.

Procedimientos no quirúrgicos: procedimientos que incluyen manipulación (métodos de sujeción o inmovilización) y administración de sustancias (vías, uso de radiación) de manera no instrumental para el diagnóstico, tratamiento o rehabilitación que no involucran incisión de los tejidos.

Procedimientos quirúrgicos: manejos o intervenciones en animales que involucren incisión de tejidos u órganos. Todo procedimiento quirúrgico debe realizarse bajo estrictas medidas de asepsia y protocolos anestésicos/sedantes y/o analgésicos apropiados para la intervención.

Sedantes: fármaco que produce una depresión central acompañada por somnolencia, el individuo puede o no estar consciente de lo que ocurre a su alrededor, pero si responde a estímulos dolorosos. Pueden utilizarse para procedimientos poco o no invasivos, que requieren de cooperación del animal. Puede ir acompañada de anestesia local.

Tranquilizante: fármaco que posee un efecto calmante, sin alteración de la consciencia. Genera modificación de la conducta, por lo que el individuo estará relajado, pero consciente; puede no responder a estímulos dolorosos de muy baja intensidad. Ayudan a reducir el estrés del animal, puede utilizarse para exploración física o toma de muestras en animales nerviosos.

ANEXO II

Protocolo de supervisión para Roedores modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985) (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985).

Protocolo de supervisión para roedores de laboratorio		
Variable	Rangos	Puntuación
Pérdida de peso (de 0 a3)	● Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente).	0
	● Pérdida de peso inferior al 10%.	1
	● Pérdida de peso entre el 10% y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de heces.	2
	● Pérdida de peso superior al 20%, el animal con consume agua ni alimento.	3
Aspecto (de 0 a3)	● Normal.	0
	● Pelo en mal estado.	1
	● Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.	2
	● Postura anormal.	3
Comportamiento espontáneo (de 0 a3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Inactividad	2
	● Automutilación, vocalización anormales, animales muy inquieto o inmóviles.	3
Comportamiento en respuesta a manipulación (de 0 a3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Cambios moderados	2
	● Animales agresivo o comatoso	3
Constantes Vitales (de 0 a3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Cambios en la temperatura corporal de 1-2°C, incremento del 30% en frecuencia Cardiac o respiratoria.	2
	● Cambios en la temperatura corporal de >2°C, incremento del 50% en frecuencia Cardiac o respiratoria.	3
Puntuación Total		

Nota: cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro todas las 3 pasan a 4. Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

Puntuación:

Desde 0-4

normal

Desde 5-9

supervisar cuidadosamente considerar el uso de analgésicos

Desde 10-14

sufrimiento intenso: administrar analgésicos (¿eutanasia?)

Desde 15-20

eutanasia

ANEXO III

Protocolo de supervisión para Peces modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985) (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985).

Protocolo de supervisión para peces		
Variable	Rangos	Puntuación
Nado regular	Normal (nada en forma continua, describiendo círculos, utilizando todo el estanque y manteniendo verticalidad)	0
	Sub-normal 1 (nada en forma continua, con trayectoria clara, mantiene verticalidad, no utiliza todo el espacio del tanque)	1
	Sub-normal 2 (nada en forma continua, mantiene verticalidad, sin trayectoria clara, no utiliza todo el espacio del tanque)	2
	Sub-normal 3 (el pez nada en forma errática, sin trayectoria clara, pierde verticalidad)	3
Respuesta a la alimentación	Normal (responde de forma inmediata a la presencia de alimento luego de un periodo de ayuno nocturno)	0
	Sub-normal 1 (después de un periodo de ayuno nocturno el pez demora más de 5 segundos en responder a la presencia de alimento)	1
	Sub-normal 2 (después de un periodo de ayuno nocturno el pez responde de forma errática a la presencia de alimento)	2
	Sub-normal 3 (después de un periodo de ayuno nocturno el pez no responde a la presencia de alimento, el alimento cae al fondo del estanque y permanece sin ser consumido)	3
Comportamiento espontáneo	Normal (atento al medio, responde a la presencia de personal de laboratorio, interactúa con sus pares)	0
	Sub-normal 1 (Atento al medio, responde a la presencia de personal de laboratorio, interactúa en forma errática o agresiva con sus pares)	1
	Sub-normal 2 (Responde con demora a estímulos externos, no interactúa con los pares separándose del grupo)	2
	Sub-normal 3 (no responde a estímulos del medio y permanece en el fondo del estanque)	3
Estado de las aletas	Normal (sin erosión ni anomalía evidente de aletas)	0
	Sub-normal 1 (Erosión leve de aletas, borde exterior partido, sin exposición de los radios de las aletas)	1
	Sub-normal 2 (Erosión evidente de aletas, se agrega a los síntomas anteriores: exposición de los radios de las aletas, hemorragia e inflamación leve)	2
	Sub-normal 3 (Erosión severa, todos los síntomas anteriormente descritos presentes)	3
Puntuación Total		

Nota: Cuando un estanque obtiene un puntaje de 3 en más de una variable, todos los "3" pasan a "4". Las medidas correctivas de acuerdo a la puntuación para cada estanque son las siguientes:

Puntuación:

Desde 0-3: Normal

Desde 4-7: Supervisar cuidadosamente (considerar cambio en manejo)

Desde 8-11: Sufirimiento intenso, administrar analgésicos (considerar eutanasia)

Desde 12-16: Eutanasia

La evaluación será realizada por personal que conoce el comportamiento de los peces incluyendo al investigador responsable del proyecto y al personal técnico entrenado para el monitoreo de los estanques experimentales. **El protocolo debe ser visado por un Médico Veterinario con experiencia en peces.**

ANEXO IV

Niveles de Dolor o Aflicción

- A. Mínimo dolor y estrés:** Mínima molestia de los animales durante procedimientos NO QUIRÚRGICOS. Ejemplos: sujeción para observación o exámenes físicos, toma de muestras de sangre, inoculación de sustancias en pequeñas cantidades por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral, pero no intratorácica o intracardiaca (Categoría B), estudios agudos sin supervivencia en los cuales los animales son completamente anestesiados y no recobran la conciencia, períodos cortos de privación de agua y comida (equivalentes a los que podrían ocurrir en condiciones naturales) o modificaciones ambientales leves, métodos de eutanasia con rápida pérdida de conciencia (sobredosis de anestésicos, decapitación luego de sedación o anestesia).
- B. Dolor asistido por medidas apropiadas:** Mínima dolor o aflicción debido al uso de medicamentos apropiados para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Es el caso de la mayoría de los procedimientos QUIRÚRGICOS asociados a protocolos anestésicos y analgésicos apropiados. Ejemplos: canulación o cateterización de vasos sanguíneos o cavidades corporales bajo anestesia; cirugías menores bajo anestesia general o local tales como biopsias, laparoscopia; cirugías mayores bajo anestesia general con recuperación subsiguiente; sujeción o inmovilización por tiempos cortos pero que por observación evidencian leve discomfort o stress del animal; tiempo prolongado (varias horas) de inmovilización; inducción de conductas estresantes; inducción de anormalidades anatómicas, fisiológicas o enfermedades que ocasionan dolor o stress pero que esta aliviado por medidas apropiadas. Procedimientos en esta categoría no deberían causar cambios significativos en la apariencia general del animal ni en parámetros tales como frecuencia cardiaca, respiratoria, excreción urinaria y fecal, o comportamiento social.
- C. Dolor no asistido por medidas apropiadas:** Dolor o aflicción sin el uso de medicamentos para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Si existen animales en esta categoría, el investigador debe tener una clara y sólida justificación. Ejemplos: exposición a noxas o agentes cuyos efectos son desconocidos; exposición a drogas o químicos en niveles que pueden causar la muerte, dolor severo o gran stress; estudios de comportamiento en los cuales el nivel de stress producido se desconoce; uso de relajantes musculares o drogas que producen parálisis sin usar previa anestesia; quemaduras o traumas dolorosos en animales conscientes; y todo otro procedimiento que pueda ocasionar stress severo u ocasione dolor intenso que no pueda ser aliviado por analgésicos (por ejemplo ensayos de toxicidad o infecciones experimentales en los cuales el final del experimento es la muerte del animal). Exposición a drogas o químicos en niveles incompatibles con los sistemas fisiológicos y que induzcan un malestar crónico sin medidas paliativas. Los estudios asociados a esta categoría no debiesen ser muy prolongados o de severo daño clínico para disminuir al máximo el tiempo de exposición al dolor y aflicción. El malestar puede detectarse por marcada anormalidad en los patrones de comportamiento, ausencia de “acicalamiento”, deshidratación, “vocalización” anormal, anorexia prolongada; letargia; trastornos al caminar y moverse, o signos clínicos severos de infección local o sistémica.