

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