



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA CI50 DEL 1,3-BIS (4-FENIL-1H-1, 2, 3-
TRIAZOLIL) -2- PROPRANOLOL Y SU RELACIÓN CON NF - KB
COMO BLANCO TERAPÉUTICO EN CÉLULAS CON CÁNCER DE
MAMA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE JIMÉNEZ ALCÁNTARA

ASESOR EXTERNO:

DR. EN C. ENRRIQUE MORALES AVILA

ASESOR INTERNO:

DR. EN C. JONNATHAN GUADALUPE SANTILLAN BENITEZ



TOLUCA, MÉXICO

MAYO 2018



UAE Mex

Universidad Autónoma
del Estado de México





UAE Mex

Universidad Autónoma
del Estado de México





UAE Mex

Universidad Autónoma
del Estado de México



AGRADECIMIENTO

Le agradezco al Dr. Erick Cuevas Yañez por facilitar la molécula de interés para este proyecto, ya que a su cargo se encontró la síntesis de dicha molécula.

Agradezco la accesibilidad que mostró para el manejo de la información requerida para llevar a cabo este proyecto.



DEDICATORIA

“La felicidad no está en la ciencia, sino en la adquisición de la ciencia”.
Edgar Allan Poe.

El presente trabajo se logró gracias a mucho esfuerzo, trabajo, dedicación y apoyo de muchas personas, por lo cual agradezco a Dios el tenerlas en mi vida ya que son personas sinceras e incondicionales.

Primero agradezco a mi madre Lucia, quien me brindo la luz para elegir esta licenciatura y esta forma de vida, me enseñó y educo para ser una persona fuerte y consiente. Me apoyo en todo momento, me brindo su consejo y su atención. Tuvo un giro en su vida y con ello mi vida cambio, buenos y peores momentos que me han servido para mi vida ya que he mejorado como persona. Gracias a ti ... realice este trabajo y se que desde arriba me seguiste apoyando y estas viendo este logro, aunque no estés físicamente se que eres mi ángel que me cuida y esta en todo momento, siendo mi colibrí.

Agradezco a mi padre Jesús por su apoyo brindado e impulso, así como a mis hermanos Carlos, Erick y Diana, ya que me brindaron tiempo y paciencia para poder culminar este proyecto; siempre cuento con ustedes, lo cual agradezco de tenerlos como familia.

Agradezco a mi director de Tesis Jonnathan, quien me brindo paciencia y tiempo para poder culminar este paso, así como las herramientas para crecer y mejorar como profesionista, siempre recibí tu apoyo.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



Agradezco a mis amigos Susana y Lilian, quienes me han impulsado en este camino brindándome su tiempo y consejos.

Agradezco a Marlene, Elvia, Leticia, por brindarme la paciencia, tiempo y apoyo en mi crecimiento laboral, me brindaron su confianza, experiencia y consejos; así como la empresa en la cual las conocí y me desarrolle.

Agradezco a César por su cariño y apoyo, me has brindado nuevas perspectivas, confidencialidad, apoyo e incondicionalidad, gracias por formar parte de mi vida y permitirme formar parte de la tuya.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO I

RESUMEN

1. 1 INTRODUCCIÓN.

Determinación de la C150 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2- propanolol y su relación con NF-kB como blanco terapéutico en células con cáncer de mama



El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Un tumor maligno es un grupo de células cancerosas que pueden crecer (invadir) los tejidos o se pueden propagar (metástasis) a áreas distantes del cuerpo.¹

1.2 MARCO TEÓRICO.

Se ha refinado la síntesis de azoles, los cuales son una clase importante de compuestos orgánicos biológicamente activos. Un gran número de estos derivados muestran una actividad interesante contra el cáncer.¹⁷ Por lo cual conocer el metabolismo del agente terapéutico es determinante, define su farmacocinética y disposición. En algunos casos, la transformación metabólica puede producir metabolitos tóxicos con potenciales implicaciones.¹⁸

En este caso se evaluará el 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, ver Figura 1.

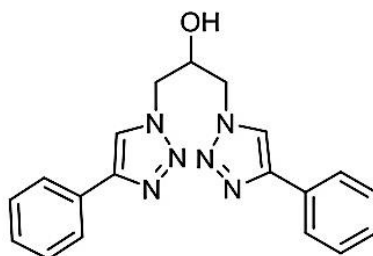


Fig 1. 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil)-2-propanolol.

Puesto que el concepto de la concentración inhibitoria máxima media (CI50) se utiliza ampliamente para el estudio de inhibición de reacciones enzimáticas reversibles, es importante entender claramente el diseño experimental y las técnicas del modelo matemático utilizado para generar valores correctos de CI50. La parte más importante del modelo matemático es seleccionar el correcto y tener un firme entendimiento de cómo manejar los valores atípicos en los datos.²³



1.3 OBJETIVO GENERAL.

Establecer la Concentración Inhibitoria 50, del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil)-2-propanolol, determinando su viabilidad para ser usado como pro fármaco en el tratamiento de enfermedades como el Cáncer de mama, relacionando su posible efecto sobre el gen NF-kB, como blanco terapéutico en células con cáncer de mama.

1.4 MATERIAL Y MÉTODO.

Se realizo cultivo celular para evaluar al compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil)-2-propanolol, se realizo usando medio de cultivo RPMI, usando cámara de Neubauer para el conteo de células muestras, por medio de azul de tripano. Se evaluaron los resultados obtenidos por método estadístico Probit.

1.5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los datos obtenidos de la concentración inhibitoria 50 muestra un resultado de 21.5 μM , ya que muestra respuesta a las diferentes concentraciones, sin embargo el coeficiente de variación es alto esto se debe a que los métodos biológicos al contar con una matriz compleja, con variación inter-individuo, genera mayor variación, siendo validos los ensayos. El 60 % de la población total, tiene sobrepeso el cual influye en la respuesta inmunológica, ya que el cuerpo presenta estadios de inflamación y con ello propicia las anormalidades en el crecimiento celular. Por ello en este estudio se estableció la relación de expresión génica de NF-KB, a pesar de que no se estableció la relación en las muestras utilizadas de este gen.

1.6 CONCLUSIÓN.

Se requieren más estudios para determinar que el compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil)-2-propanolol pueda funcionar como un pro fármaco viable para su estudio y aplicación en enfermedades como el cáncer de mama, aunque muestra respuesta letal, a concentraciones cuatro veces baja de la concentración del cien porciento, con ello evitando efectos secundarios a los pacientes y con ello establecer una forma farmacéutica apta para su uso, así como estudios “*in vivo*” para su completo estudio y aplicación, ya que al por lo resultados obtenidos pertenece a la BCS Clase II.



CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES.



Avanzo R. et al, demostró que estructuras que contienen un anillo de 1,2,4-triazólico unidos por azufre para el resto del carbohidrato mostró una actividad moderada antiproliferativa. La presencia del segundo anillo heterocíclico no mostró cambios significativos en su actividad biológica. Mientras tanto, las estructuras con 3-tiobencilo-5-sustituido-1,2,4-triazol, vinculados por el nitrógeno conduce a compuestos con un comportamiento bifásico, la estimulación de la proliferación celular a bajas concentraciones y la inhibición en concentraciones superiores. Un incremento en la polaridad se asoció con una disminución de la actividad de los compuestos evaluados. Un examen preliminar antitumoral señaló las estructuras 1, 2, 4-triazólicos vinculados a azúcares son prometedores para estudios posteriores.²⁰

La gran actividad biológica de los compuestos derivados de azoles ha llamado la atención para su estudio, Pitucha M, et. al, evaluó la actividad antiproliferativa del bis-1,2,4-triazol-3-ona, en dos líneas celulares humanas, derivadas de pulmón y células con cáncer. Una línea celular normal se incluye en el estudio de la citotoxicidad, la cual es la línea celular primaria de fibroblastos de piel humana (HSF). Los resultados para cada compuesto probado se reportan como el porcentaje de inhibición del crecimiento de las células en comparación con las células no tratadas. De acuerdo con los datos obtenidos algunos derivados de esta molécula, se encontraron eficaces contra el carcinoma de pulmón "*in vitro*".¹⁷

Los compuestos investigados, exhiben efectos dependientes de la dosis. Pitucha M, et al, observo la acción más evidente para todos los compuestos examinados en una dosis de 50 µg mL⁻¹.¹⁷

La evaluación realizada de los compuestos es en base a la EMA y la FDA, Webber G. recomienda usar el enfoque para la evaluación de la inhibición dependiente del tiempo (TDI), la cual se caracteriza por un aumento de la potencia inhibidora (CI50 = concentración que causa una inhibición del 50%) observada después de un período de activación metabólica.¹⁹

De la misma manera Avanzo R. et. al, evaluó derivados de triazol y sus análogos los cuales tienen fuerte citotoxicidad en contra de varias células de cáncer humano. Por ejemplo, Peng y col. reporto dos nuevos N-ariltriazoles con actividad antiproliferativa, contra un potente fármaco resistente relacionado con la apoptosis de la línea celular del cáncer de páncreas. También se



ha informado que la actividad biológica de compuestos que contienen un anillo triazólico en su estructura, permite la interacción de la unión fuerte de hidrógeno, lo cual es debido al alto momento dipolar de este heterociclo. Además, este heterociclo es estable a la hidrólisis ácida y básica, así como en condiciones reductoras / oxidativas.²⁰

Además, Kamal et al. han descrito recientemente un nuevo 3,5-diarilisoaxazolina vinculado 2,3-dihidroquinazolinona como un buen candidato para desarrollar más agentes anticancerígenos. Teniendo en cuenta el potencial de la actividad antiviral y / o antitumoral de los compuestos diheterocíclicos, se han centrado en el diseño y síntesis de posibles estructuras antitumorales que contienen un anillo de 1,2,4-triazol y un anillo isoxazolina como el segundo farmacóforo. Estructuras como los 1,2,4-triazólicos unidos por azufre mostró una actividad moderada antiproliferativa, 3-tiobencilo-5-sustituido-1,2,4-triazol, vinculados por el nitrógeno conduce a compuestos con un comportamiento bifásico, la estimulación de la proliferación celular a bajas concentraciones y la inhibición que en los superiores.²⁵

De la misma manera XiaYi. et. al, estudio la orientación del factor de choque térmico con un análogo de nucleósido triazol para provocar la actividad contra el cáncer de pulmón; esto se deriva del análisis de la respuesta de la célula ante choque térmico, la exposición a iones de metales pesados o agentes citotóxicos, las células responden mediante la sobre expresión de proteínas de choque térmico (HSP), que protegen las células y les permiten sobrevivir bajo condiciones por lo demás estresantes y letales. En efecto HSF1 puede regular una multitud de vías de señalización y metabólicas para promover la supervivencia de las células. Además, las células cancerosas son células más dependientes de HSF1 de lo normal para la proliferación y la supervivencia debido a la constante exposición de las células cancerosas a las tensiones tanto de procesos oncogénicos internos (tales como proteínas mutadas y las vías de señal desregulados) y los factores ambientales externos (tales como la hipoxia y la privación de nutrientes). Lo antes mencionado se evaluó mediante un cultivo celular, midiendo la inhibición del crecimiento celular; sembrando en una placa de 96 pocillos a 15.000 y 10, 000 células por pocillo, respectivamente, se dejaron adherir durante la noche. Después el medio de cultivo se retiró y se reemplazó con medio fresco. Después de 48 h de tratamiento con el (3- (4,5-dimetil tiazol-2-il) -2,5 difenil bromuro de tetrazolio), el número de células viables se determinó por



ensayo colorimétrico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y repetidos independientemente.²²

Posteriormente se evaluó cuantitativamente la expresión de HSF1, STAT3 y AKT, por PCR en tiempo real, utilizando RNA transcritas a cDNA, por medio de ciclado térmico. Cada muestra se analizó por triplicado en la reacción de PCR para estimar la reproducibilidad de los datos. También se evaluó por medio de ELISA, Western Blot, Citometría de Flujo, encontrando resultados favorables.²²



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA



3.1 IMPORTANCIA DEL PROBLEMA.

Debido a la alta incidencia del cáncer de mama y a la variabilidad de la respuesta al tratamiento entre los pacientes, es necesario crear nuevos compuestos con gran potencial biológico, es decir farmacóforos, lo cual implica evaluar su actividad, ya que estudios de moléculas con posible potencial terapéutico contra el cáncer han mostrado toxicidad. En este caso no se ha evaluado la citotoxicidad del 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil)-2-propanolol evitando su aplicación en estudios de interés, así como la relación entre un potencial blanco terapéutico como lo es NF- κ B.

3.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La CI50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2-propanolol se encontrara entre 15 μ M y 20 μ M en cultivos de leucocitos, de acuerdo a la respuesta cuantal el 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2-propanolol tendrá un efecto inhibidor de la expresión génica de NF- κ B siendo un probable blanco terapéutico.

3.3 JUSTIFICACIÓN.

Diversos farmacóforos con interés terapéutico en el cáncer de mama han mostrado toxicidad en bajas concentraciones por lo cual es necesario evaluar mediante indicadores de toxicidad “*in vitro*” o citotoxicidad, la concentración de muerte celular, por medio de la CI50, la cual se determinara en cultivo celular de leucocitos; evaluando la concentración a la cual este triazol no es toxico a nivel celular. También se evaluara la expresión génica de NF- κ B, la cual se analiza como un posible blanco terapéutico, relacionando la expresión génica con la CI50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2-propanolol.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO IV

OBJETIVO



4. OBJETIVO.

Establecer la Concentración Inhibitoria 50, del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil)-2-propanolol, determinando su viabilidad para ser usado como pro fármaco en el tratamiento de enfermedades como el Cáncer de mama, relacionando su posible efecto sobre el gen NF-kB, como blanco terapéutico en células con cáncer de mama.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO V

MARCO TEORICO



5. GENERALIDADES DEL CÁNCER.

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Un tumor maligno es un grupo de células cancerosas que pueden crecer (invadir) los tejidos o se pueden propagar (metástasis) a áreas distantes del cuerpo.¹ El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, lo que representa 8.2 millones de muertes en 2012.² El cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon y de mama causan la mayoría de las muertes cada año; de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO) el cáncer de mama produce 521 000 muertes.³ Por lo cual es el cáncer más común en los países desarrollados y las regiones en desarrollo ya que hay cerca de 690 000 nuevos casos en relación población 1:4.⁴

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea, que comprende varias entidades tumorales asociados a patrones histológicos distintivos, diferentes características biológicas y comportamiento clínico.⁷ El cáncer de mama se percibía históricamente como una enfermedad con diferentes respuestas al tratamiento sistémico y con diversas características histopatológicas. En la década de 1970 la enfermedad comenzó a ser dividida en dos subconjuntos en base a la expresión de los receptores de estrógenos (ER), en vista de las distintas características clínicas que muestran estos subgrupos. La decisión de tratamiento es de naturaleza pronóstica y se basa únicamente en las variables clínico - patológicas, tales como el tamaño del tumor, la presencia de metástasis a los ganglios linfáticos, el grado histológico y la presencia de tres marcadores: ER, PR, HER2.⁸

De acuerdo a la American Cancer Society (2014)¹, se clasifica el cáncer de mama de la siguiente manera:

- El carcinoma ductal in situ.



- El carcinoma lobular in situ.
- Invasoras (o infiltrante) El carcinoma ductal.
- Invasoras (o infiltrante) El carcinoma lobular.

Los tipos menos comunes de cáncer de mama:

- Cáncer de mama inflamatorio.
- Cáncer de mama triple negativo.
- Enfermedad de Paget del pezón.
- Tumor filoides.
- Angiosarcoma.

El estudio patológico permitió distinguir los diferentes tipos histológicos y el grado de diferenciación celular. La inclusión de nuevas tecnologías, como la inmunohistoquímica, permitió identificar factores pronósticos, predictivos, más precisos y bien validados en la actualidad. En fechas recientes, con el desarrollo de la biología molecular, ha surgido la oncogenómica, una nueva rama de la medicina que estudia la caracterización genómica de las neoplasias.⁹

5.1 EPIDEMIOLOGÍA.

La Organización Mundial de la Salud (WHO), posee datos de mortalidad de los años 1958 – 2010, en los cuales se observa el incremento de la incidencia de esta enfermedad.⁵

En México se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, en la cual para fines de esta Norma los factores de riesgo de desarrollo del cáncer de mama se distinguen en cuatro grandes grupos ⁶ :

1. Biológicos.



2. Iatrogénicos o ambientales.
3. Historia reproductiva.
4. Estilo de vida.

Es importante mencionar que en el 70% de las mujeres con cáncer de mama, no se logra identificar un factor de riesgo conocido. La vigilancia epidemiológica del cáncer de mama forma parte del SINAVE, que cumple con las disposiciones del CONAVE y cuenta con el consenso de las instituciones que lo conforman.⁶

Requieren ser objeto de vigilancia epidemiológica los casos probables y confirmados de cáncer de mama por las instituciones del Sistema Nacional de Salud. La vigilancia epidemiológica del cáncer de mama es un instrumento para determinar la magnitud del problema de salud, así como para apoyar las actividades de monitoreo y evaluación del programa por lo que incluye los procesos de detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento.⁶

En las mujeres mexicanas, a partir del año 2006, el carcinoma mamario se convirtió en la primera causa de muerte por cáncer. Datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), indica que en 2009 ocurrieron 4,964 decesos atribuibles al cáncer de mama, lo que representó el 2% del total de defunciones ocurridas en mujeres. Esto significa que en ese año murieron por cáncer de mama casi 14 mujeres cada día. La tasa de mortalidad específica para el año 2009 en el grupo de mujeres de 40 a 49 años de edad fue de 14.9 por 100 mil; en las de 50 a 59 años de edad de 29.1, en las mujeres de 60 a 69 de 37.0 y en las de 70 o más años de edad la mortalidad fue de 53.1 por 100 mil. En la última década, se observa que la tendencia es ascendente en todos los grupos de edad, con un incremento mayor en las mujeres mayores de 60 años, en comparación con las mujeres de 40 a 59 años.⁶

5.2 BASES GENÓMICAS DEL CÁNCER DE MAMA.

Se observa que la incidencia y la mortalidad a causa del cáncer de mama sigue en aumento, por lo cual es importante contar con protocolos de medidas preventivas, con ello disminuir los factores de riesgo y además brindar tratamientos adecuados para el diagnóstico proporcionado. Además, la aplicación de nuevas tecnologías, nos proporciona herramientas adecuadas para el



desarrollo de nuevas terapias dirigidas a genes específicos relacionados con el cáncer de mama.

5.3 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.

Una estrategia para la gestión de las mujeres, en mayor riesgo familiar de cáncer de mama y de ovario; incluye la evaluación genética, quimioprevención, cribado radiológico y el autoexamen clínico. Las pruebas genéticas deben ocurrir dentro de una clínica adecuada después del asesoramiento genético.¹

A partir de perfiles moleculares se ha conseguido una mejor clasificación de los tumores y el desarrollo de nuevos fármacos, así como nuevos productos que tienen ya una aplicación clínica e instrumentos de evaluación de riesgo y respuesta terapéutica.¹⁴

Las características histopatológicas del cáncer pueden ser impulsadas por alteraciones genéticas específicas, proporcionando evidencia directa de las correlaciones genotipo - fenotipo entre los patrones morfológicos y los cambios moleculares en el cáncer de mama.⁷

Por lo cual se han desarrollado nuevos métodos moleculares para determinar el tipo y grado del tumor; con ello brindar una terapia adecuada para el paciente, identificando nuevos blancos terapéuticos y nuevos marcadores biológicos para determinar el grado de riesgo de la población, mediante un cribado. De acuerdo a la identificación de marcadores, grado histológico, proliferación, resultado del tratamiento y el final de la enfermedad ⁸, se han identificado a nivel molecular los siguientes tipos de cáncer ^{8,10, 11}.

- 5.3.1. Luminal A.
- 5.3.2. Luminal B.
- 5.3.3. Similar Basal.
- 5.3.4. HER2 enriquecido.
- 5.3.5. Similar al cáncer de mama normal.
- 5.3.6. Bajo Claudin.
- 5.3.7. Apocrinas moleculares.



Los primeros trabajos que analizaron los cambios en los patrones de expresión génica en el tejido mamario se llevaron a cabo al comparar la expresión de 8 102 genes en 65 muestras quirúrgicas de cáncer de mama para obtener “firmas” o “fotografías” moleculares de cada tumor. Los resultados de dicho estudio evidenciaron la presencia de diversos fenotipos moleculares y ello sugirió la existencia de una gran diversidad biológica en los tumores mamarios.¹⁴

5.4 NF-kB: DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA Y UN BLANCO POTENCIAL PARA EL TRATAMIENTO.

Uno de los genes implicados en el desarrollo del cáncer de mama es NF- kB, el cual se descubrió hace aproximadamente 28 años; NF- kB es un factor de transcripción latente en la mayoría de células de los mamíferos, su estado inhibido se activa rápidamente por diversos estímulos inductivos. A través de diversos estudios se ha encontrado que NF- kB es polimórfico, es decir no es unitario. NF- kB tiene un papel crítico en muchos procesos fisiológicos normales, está implicado en muchas patologías, especialmente en el desarrollo de cáncer, ya que sus actividades se integran con las actividades de muchos otros reguladores transcripcionales.¹⁵

La respuesta inflamatoria de los vertebrados es la manifestación más evidente de la inmunidad innata y es un proceso complejo, que implica muchos pasos para la protección de la integridad del organismo. La respuesta inmune adaptativa, que se encuentra en los vertebrados superiores, también es regulada por NF-kB.¹⁵

Casi todos los receptores del sistema inmune innato y adaptativo activan factores de transcripción de NF- kB. Este gen activado se une a secuencias diana e induce la expresión de una gran cantidad de genes que codifican moléculas que conducen a la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de las células de la respuesta inmune, así como factores tales como, citocinas proinflamatorias; además en diferentes niveles moleculares en la vía de señalización de NF- kB permite mantener la homeostasis del tejido.¹⁶

La activación de NF- kB es inducida por un gran conjunto de genes, pero antes de recibir un estímulo inductivo, esos genes tienen expresión baja o indetectable, lo que sugiere que hay dos



tipos de genes inducibles: aquellos a punto para la inducción y aquellos bloqueados por nucleosomas que requieren procesos de remodelación de la cromatina antes de que puedan responder. Un importante mediador es el homodímero p50 (p50 - p50).¹⁵

NF- κ B es uno de los factores de transcripción más complejos, con cinco subunidades (p50, p52, RelA, RelB, c-Rel), una familia de inhibidores de NF- κ B (I κ BS) y el complejo de quinasa de activación (IKKa, IKKB y IKKc / NEMO). La combinación de estos factores en la estructura y la regulación, genera enormes funciones fisiológicas. En general, las formas NF- κ B, hetero u homo-dímero son secuestradas por IKBS en el citoplasma en la fase de reposo; tras la estimulación, IKBS son fosforilados por quinasas y degradados a través de la vía de ubiquitinación en el proteasoma, liberando de este modo el dímero NF- κ B activo en el núcleo para regular la transcripción de genes. Las principales quinasas fosforilantes IKBS son complejos IKK; otras quinasas (por ejemplo, NIK, GSK3b, CKII, PKC, PKA, PKR, etc.) también están involucrados directa o indirectamente a través de IKK en condiciones específicas para mejorar la regulación de NF- κ B. Un ejemplo interesante es PKR (dsRNA la proteína quinasa activada), es altamente inducida por el interferón, la infección por virus y otros tipos de estrés, lo que lleva a la detención del crecimiento celular mediante la inhibición de la traducción del ARNm. Pero también muestra actividad pro-supervivencia a través de la activación de IKKB. Hay tres vías de señalización de NF- κ B (canónica, alternativo y NF- κ B1/p105) que responden a diferentes condiciones ambientales, celulares, en diversos tipos de células y tejidos para funciones específicas.²¹

La activación del factor de transcripción NF- κ B se encuentra con frecuencia en las células tumorales y contribuye al crecimiento agresivo del tumor, resistencia a la quimioterapia y la radiación ionizante durante el tratamiento del cáncer. La acumulación de pruebas en los últimos años indican que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos y la radiación activa NF- κ B *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, la inducción de quimio resistencia y radio resistencia es mediada a través de varios genes regulados por NF- κ B y la inhibición de este factor de transcripción aumenta la sensibilidad de las células cancerosas a la acción apoptótica de agentes quimioterapéuticos y exposición a la radiación. Se explora el papel de NF- κ B y sus genes regulados en la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia, la radiación y se evalúa



la importancia de la orientación de NF- κ B con un enfoque terapéutico potencial para superar quimio resistencia y radio resistencia para el tratamiento del cáncer.²³

Desde la identificación del factor de transcripción NF- κ B y la clonación de los genes NF- κ B y I κ B codificantes, una gran número de evidencias experimentales han acumulado lo que demuestra que este factor juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de diversos tipos de cáncer. Tal actividad constitutiva puede ser vinculada a reordenamientos genéticos que conducen a la expresión génica de NF- κ B, a mutaciones del inhibidor I κ B α o aumento de la actividad IKK. Además, los mecanismos de acción de varios fármacos antiguos, han sido re-evaluados y algunos de ellos fueron descubiertos para actuar parcialmente, a través de la inhibición de NF- κ B. Sin embargo, el papel de NF- κ B en el control de la apoptosis no es inequívoca y este factor es también, en algunas condiciones experimentales, requerido para la inducción de la apoptosis, ya sea de células mutadas o en respuesta a los agentes anti-cáncer.²⁴

La expresión constitutiva de NF- κ B conduce a la activación de varios factores implicados en la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular para la metástasis del cáncer. La inhibición de NF- κ B en células tumorales reduce el crecimiento, a través de la activación de genes anti apoptóticos, desempeñando un papel importante en la protección de las células contra los inductores de la apoptosis, incluyendo fármacos quimioterapéuticos.¹⁸

Muchos profármacos como lo son tiazolidonas, tiadiazolia y triazoles además de poseer características bactericidas, anti fúngicas y anti-inflamatorias es probable que lleven a cabo ciertos efectos sobre NF- κ B y su función en la inflamación.³¹

Dada la relevancia de NF- κ B en las enfermedades humanas como el cáncer y el hecho de que muchos fármacos interfieren con la señalización de NF- κ B, esta vía nos proporciona un blanco terapéutico muy atractivo para el desarrollo terapéutico.²¹

Varios agentes anti-inflamatorios incluyendo glucocorticoides, inmunosupresores; se han desarrollado para bloquear la activación de NF- κ B. Algunos inhiben fuertemente la activación de NF- κ B por mecanismos que no se comprenden completamente, pero probablemente incluyen la inhibición de la unión al ADN y la actividad de IKK. El raloxifeno puede actuar a través



del receptor de estrógeno para inhibir la activación de NF- κ B. AINES tales como salicilato de sodio y sulindac se han reportado por inhibir la activación de NF- κ B mediante la inhibición de la fosforilación de I κ B α . En concentraciones más altas, la aspirina ha demostrado bloquear la actividad de NF- κ B mediante la unión directamente y la inhibición de la actividad quinasa de IKK β mediante la reducción de su capacidad para unirse al ATP. Otros AINES, como el ibuprofeno y la indometacina también se ha reportado la inhibición de la activación de N- κ B en cultivo celular.²⁶

En muchos 1, 2, 3 -Triazoles incluidos bis-triazoles se encontró una potente actividad antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatoria, anestésico local, anti-convulsiva, antineoplásica, antipalúdico y como agente antiviral. Algunos de ellos mostraron actividad anti-proliferativa y varios se utilizan como agentes de escisión de ADN y activadores de los canales de potasio.²⁷

Se ha refinado la síntesis de azoles, los cuales son una clase importante de compuestos orgánicos biológicamente activos.

Entre los derivados de azoles tales como el 1, 2, 4-triazol, poseen diversas propiedades farmacológicas, tales como: antibacteriano, anti fúngico, antiviral, anti-inflamatorio, anticonvulsivantes, antidepresivo, antituberculoso, antitumoral, antihipertensivo, analgésico, antiparasitario. En la medicina, diversos medicamentos potentes poseen el núcleo triazol, como alprazolam (ansiolítico y tranquilizante), anastrozol, letrozol, vorozol (antineoplásicos e inhibidores de la aromatasas no esteroideas competitivos), ribavirina (agente antiviral).¹⁶

Un gran número de estos derivados muestran una actividad interesante contra el cáncer.¹⁷ Por lo cual conocer el metabolismo del agente terapéutico es determinante, define su farmacocinética y disposición. En algunos casos, la transformación metabólica puede producir metabolitos tóxicos con potenciales implicaciones.¹⁸

5.5 INTRODUCCIÓN A LA ESTÁNDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

5.5.1 COMPUESTO A EVALUAR

Por medio de este ensayo se evaluará el efecto del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, ver Figura 1.

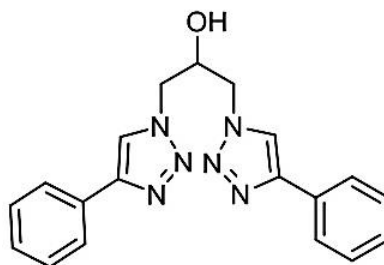


Fig. 2. 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2-propanolol.

Se caracterizaron propiedades básicas para el experimento, las cuales se requieren para ejecutar pruebas como curvas de respuesta.

5.5.2 SOLUBILIDAD

Siempre que se menciona la solubilidad, debe entenderse que es el grado de disolución de un polvo dentro de 30 min en un disolvente a la temperatura de 25°C, con agitación vigorosa durante 30 s a intervalos de 5 min. Esta propiedad se expresa en los siguientes términos:

TÉRMINOS	PARTES DE DISOLVENTE EN VOLUMEN REQUERIDAS POR 1 PARTE DE SOLUTO
Muy soluble	Menos de una parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Soluble	De 11 a 30 partes
Ligeramente soluble	De 31 a 100 partes
Poco soluble	De 101 a 1000 partes
Muy poco soluble	De 1001 a 10000 partes
Casi insoluble	Más de 10000 partes

Tabla 1. Determinación de solubilidad FEUM Úndecima Edición 2014.



El término “parcialmente soluble” se utiliza en el caso de una mezcla en la que sólo una parte de sus componentes se disuelve. Para los casos de solubilidad de un líquido en otro líquido citados en la tabla anterior es aplicable considerando la densidad del soluto. El término “miscible” se utiliza para describir un líquido que es miscible en todas las proporciones con el disolvente indicado.²⁸

Realizar stock de triazol con DMSO y hacer diluciones, aforando con el diluyente, la cantidad de DMSO debe ser menor al 10% del volumen total para no generar toxicidad.

5.6 CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

El BCS es un marco científico para clasificar sustancias farmacológicas basadas en su solubilidad y permeabilidad intestinal. Cuando se combina con la disolución del producto farmacológico, el BCS tiene en cuenta tres factores principales que rigen la tasa y el alcance de la absorción del fármaco de formas de dosificación, disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal. Según el BCS, las sustancias medicamentosas se clasifican de la siguiente manera:

Clase 1: alta solubilidad - alta permeabilidad

Clase 2: baja solubilidad - alta permeabilidad

Clase 3: alta solubilidad - baja permeabilidad

Clase 4: baja solubilidad - baja permeabilidad

Dentro de este marco, cuando se cumplen ciertos criterios, el BCS se puede usar como un medicamento herramienta de desarrollo para ayudar a los patrocinadores / solicitantes a justificar las solicitudes de bioexención.⁷²



Por lo antes mencionado basándonos en la clasificación Biofarmacéutica (BCS: Biopharmaceutics Classification System), la cual a continuación se menciona, se determina exclusivamente por la solubilidad y la permeabilidad, así como el tiempo de disolución “*in vitro*”.⁷²

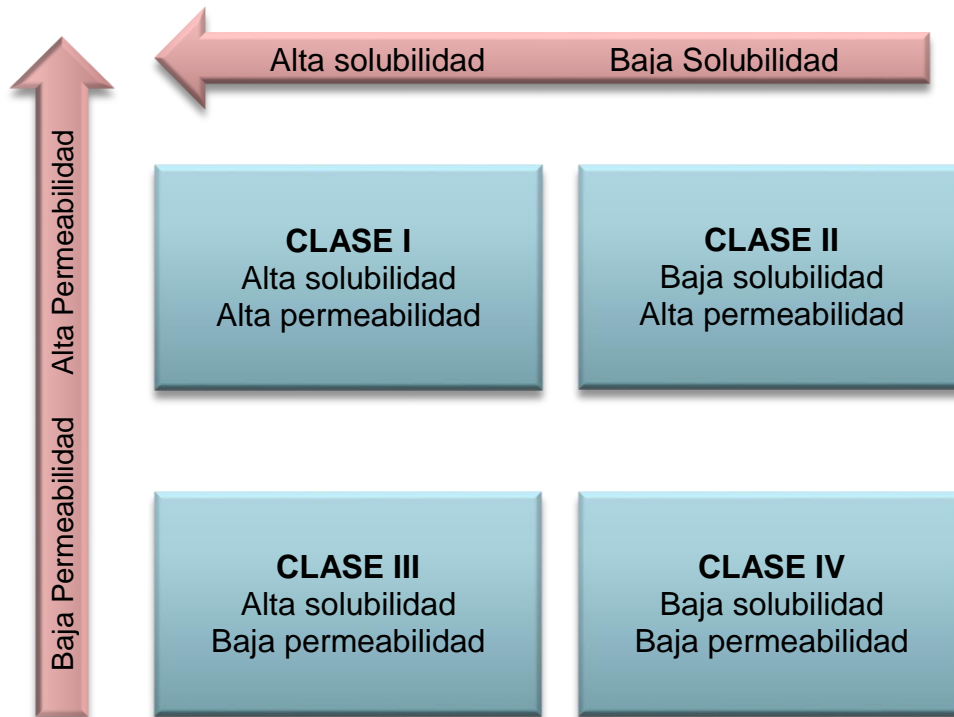


Fig 3. Clasificación Biofarmacéutica

5.7 CULTIVO CELULAR

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907. *CULTEK*

Harrison fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del



cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada. ⁶⁸

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel. ⁶⁸

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión. ⁶⁸

Roux y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan. ⁶⁸

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Sharp, 1977). Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel. ⁶⁸

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que podemos destacar : ⁶⁸



- 1948 Earle y col. (Sanford, Earle y Likely, 1948) aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos. ⁶⁸
- 1952. Gry y col. (Grey, Coffman y Kubicek, 1952) establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano. ⁶⁸
- 1954 Rita Levi-montalcini y col. establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo (Levi-Montalcini y Calissano, 1979). Este trabajo supuso el Premio Nóbel para Levi-Montalcini en 1986. ⁶⁸
- 1955 Eagle (Eagle, 1955) realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros,...) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares) ⁶⁸
- 1961 Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables. ⁶⁸
- 1965 Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente (Ham, 1965). ⁶⁸
- 1969 Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables (Augusti-Tocco y Sato, 1969). Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas. 1974 Albert Claude, George Palade y Christian de Duve recibían el Premio Nobel de Medicina por haber hecho posible la mirada cercana a ese mundo en miniatura que es la célula con sus estructuras subcelulares y organelos con las primeras fotos de una célula intacta obtenidas mediante un microscopio electrónico. ⁶⁸



- 1975 Kohler y Milstein establecen la primera línea celular híbrida productora de anticuerpos monoclonales (Koebler y Milstein, 1975). El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nóbel.⁶⁸
- 1976 Sato y col. publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (Sato y col., 1982).⁶⁸

5.8 MEDIOS Y SUPLEMENTOS

Los intervalos de pH para el crecimiento son de 7.4 a 7.7, mientras que las células transformadas crecen mejor en intervalos de 7.0 a 7.4. El rojo fenol es un indicador de pH que se utiliza ampliamente en los medios de cultivo, es rosa a pH 7.6, rojo a pH 7.4, naranja a pH 7 y amarillo a pH 6.5.⁷⁰

El CO₂ en la fase gaseosa se disuelve en el medio, estableciéndose un equilibrio con los iones de bicarbonato y estabilizando el pH. Cada medio tiene una concentración de bicarbonato y porcentaje de CO₂ recomendada para alcanzar el pH correcto.⁷⁰

La mayoría de las células cultivadas tienen una tolerancia bastante amplia a la presión osmótica. Como la del plasma humano es de 290 mOsmol/kg, es razonable asumir que éste es el óptimo para las células humanas “*in vitro*”.⁷⁰

La temperatura óptima para el cultivo celular depende principalmente de la temperatura corporal del organismo del que se obtuvieron las células. Así, la temperatura recomendada para líneas celulares de ave es de 38.5° C y para células de humano es de 37° C. Es importante controlar que la temperatura no sea mayor a la recomendada, porque las células de mamífero no toleran estar 2° C por encima de lo normal más que unas pocas horas (las de humano mueren muy rápidamente a más de 40° C). En cambio, pueden sobrevivir varios días a 4° C e inclusive, pueden congelarse a -196° C bajo condiciones especiales para evitar la formación de cristales, adicionando dimetilsulfóxido (DMSO).⁷⁰



Las soluciones salinas balanceadas se componen de sales inorgánicas y puede incluir bicarbonato de sodio y en algunos casos, glucosa. Forman la base de muchos medios completos. Ejemplos de ellas son las sales balanceadas de Earle, las de Hank y el PBS (Phosphate-Buffered Saline).⁷⁰

5.8.1 MEDIO COMPLETO

El término “medio completo” indica que se le han agregado todo los constituyentes y suplementos necesarios (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, proteínas, elementos traza, glucosa, etc.). Los aminoácidos que se agregan son los esenciales (que no pueden ser sintetizados por las células) pero en ocasiones también se agregan no esenciales, para compensar cualquier incapacidad particular de un tipo celular para producirlos. Generalmente las vitaminas presentes en el medio son las hidrosolubles, y los demás requerimientos se presume que provienen del suero. Algunos medios especiales también contienen vitaminas liposolubles. Las sales son los principales componentes que contribuyen a la osmolaridad y dependiendo del medio, su concentración puede variar, por ejemplo, para cultivos en suspensión, se reduce el calcio (para disminuir la agregación celular).⁷⁰

5.8.2 SUERO

El suero contiene factores de crecimiento (que promueven la proliferación de células), factores de adhesión y actividad antitripsina (que promueven la adhesión celular al recipiente de cultivo).⁷⁰

5.9 ENSAYOS DE RESPUESTA CUANTAL.

En este caso se evaluará el 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, expresado como viabilidad celular o como citotoxicidad.

En los diferentes profármacos se evalúa su citotoxicidad “*in vivo*” e “*in vitro*”, la última de ellas se determina mediante la Concentración Inhibitoria 50 (CI50).



Puesto que el concepto de la concentración inhibitoria máxima media (CI50) se utiliza ampliamente para el estudio de inhibición de reacciones enzimáticas reversibles, es importante entender claramente el diseño experimental y las técnicas del modelo matemático utilizado para generar valores correctos de CI50. La parte más importante del modelo matemático es seleccionar el correcto y tener un firme entendimiento de cómo manejar los valores atípicos en los datos.²³

En los ensayos de citotoxicidad basal se realizan en paralelo en las mismas células y se evalúan en células derivadas de órganos diana. Se analizan dos líneas celulares (normales y cancerosas).²⁴ La apoptosis de las células refiere a una alteración en la división celular observando citotoxicidad por lo cual se lleva a cabo el recuento celular por medio de una citometría de flujo.²⁵

En ciertos bioensayos, el analista a menudo está interesado en medir la potencia de una preparación que no genera una respuesta graduada en un sistema individual. Más bien, la respuesta es absoluta para la unidad de prueba es decir, esta responde o no a la dosis empleada dependiendo de su susceptibilidad o tolerancia. Este tipo de respuesta de todo o nada es conocida como respuesta cuantal. La tolerancia se define en función de la dosis de una preparación farmacológicamente activa, que es justamente insuficiente para provocar que la unidad de prueba involucrada muestre la respuesta establecida.^{28, 30.}

Debido a la variación en la tolerancia de las diferentes unidades de prueba, usualmente es posible seleccionar una dosis de la preparación que dará una respuesta en una cierta proporción del grupo de las unidades de prueba. Así empleando un intervalo apropiado de dosis, se hace posible establecer una relación entre dosis y respuesta.²⁸

Así las dosis que producen 30, 50, u 80 por ciento de respuesta son conocidas como las DE₃₀, DE₅₀, DE₈₀. El punto final más comúnmente empleado, es el que estima que tenga un efecto para el 50 por ciento de las unidades de prueba, ya que este valor es el que se obtiene con la mejor precisión. A la DE₅₀ algunas veces se le dan nombres diferentes, dependiendo del tipo de respuesta: DL₅₀ o dosis letal al 50 por ciento, si la respuesta es la muerte, en el caso de células



en cultivo, la DL_{50} se calcula como la concentración del compuesto necesaria para reducir la población celular al 50%, por lo que también recibe el nombre de CI_{50} .²⁸

Los métodos apropiados para estimar el punto final al 50% son aquellos basados en una solución de máxima verosimilitud o el de mínimos cuadrados perfectos (métodos formales); sin embargo hay métodos alternativos tales como el análisis Probit, es uno de los procedimientos utilizados para la estimación del punto final al 50 por ciento de una preparación y su intervalo de confianza y en su caso, la potencia relativa de una o más muestras.^{28, 31}

En el presente estudio determinara la concentración inhibitoria 50 para el compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, ya que actualmente la necesidad de sintetizar nuevos compuestos de forma rápida y eficiente ha incrementado, por lo cual se han incluido distintas metodologías para la creación de moléculas con carácter terapéutico. Tal es el caso de la síntesis de triazoles y bis-triazoles, los cuales tienen gran potencial terapéutico ya que estas moléculas contienen nitrógeno. En los diferentes profármacos se evalúa su citotoxicidad “*in vivo*” o “*in vitro*” la última de ellas se determina mediante la Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}). La expresión génica se realiza mediante PCR-Tiempo Real es decir absoluto, identificando genes relacionados al desarrollo de cáncer de mama.

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.10.1 ANÁLISIS PROBIT

Este procedimiento mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo. Es útil para las situaciones en las que se dispone de una respuesta dicotómica que se piensa puede estar influenciada o causada por los niveles de alguna o algunas variables independientes, y es particularmente adecuada para datos experimentales.⁶⁹

Este procedimiento permitirá estimar la intensidad necesaria para que un estímulo llegue a inducir una determinada proporción de respuestas, como la dosis efectiva para la mediana.⁶⁹



Es decir en este experimento se exponen células a diferentes concentraciones de un compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol y después se registra el número de células muertas y el número de células expuestas.⁶⁹

Aplicando el análisis probit a estos datos puede determinar la fuerza de la relación entre concentración y mortalidad, así como determinar la concentración adecuada del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol.⁶⁹

5.10.2 ESTADÍSTICOS.

Existen diferentes estadísticos, sin embargo no son óptimos para la determinación de la Concentración Inhibitoria 50, tales métodos estadísticos son como los Coeficientes de regresión y errores estándar, intersección y su error estándar, chi-cuadrado de Pearson de la bondad de ajuste, frecuencias observadas y esperadas e intervalos de confianza para los niveles efectivos de la variable o variables independientes. Plots: gráficos de respuestas transformadas.⁶⁹

5.10.3 CONSIDERACIONES SOBRE LOS DATOS.

Datos. Para cada valor de la variable independiente (o para cada combinación de valores para múltiples variables independientes), la variable de respuesta debe contener el recuento del número de casos que presenta la respuesta de interés y que toma dichos valores de la variable independiente, y la variable del total observado debe ser el recuento del número total de casos con dichos valores para la variable independiente. La variable de factor debe ser categórica, codificada como enteros.⁶⁹

5.10.4 OTRAS OPCIONES PARA EL ANÁLISIS PROBIT

5.10.5 ESTADÍSTICAS.

Permite solicitar las estadísticas opcionales siguientes: Frecuencias, Potencia relativa de la mediana, Prueba de paralelismo e Intervalos de confianza fiduciaria.

5.10.5.1 POTENCIA RELATIVA DE LA MEDIANA.



Muestra la razón de las potencias de las medianas para cada pareja de los niveles del factor. También muestra los límites de confianza al 95% para cada potencia relativa de la mediana. Las potencias relativas de la mediana no están disponibles si no dispone de una variable de factor, o si dispone de más de una covariable.

5.10.5.2 PRUEBA DE PARALELISMO.

Contraste sobre la hipótesis de que todos los niveles del factor tienen una inclinación común.

5.10.5.3 INTERVALOS DE CONFIANZA FIDUCIARIA.

Intervalos de confianza para la dosis del agente requerido para producir una cierta probabilidad de respuesta.

Intervalos de confianza fiduciaria y Potencia relativa de la mediana no están disponibles si se ha seleccionado más de una covariable. Potencia relativa de la mediana y Prueba de paralelismo sólo están disponibles si se ha seleccionado una variable de factor.

5.10.5.4 ÍNDICE DE RESPUESTA NATURAL.

Permite indicar un índice de respuesta natural incluso en la ausencia del estímulo. Ninguna, Calcular a partir de los datos o Valor.

5.10.5.5 CALCULAR A PARTIR DE LOS DATOS.

Estima el índice de respuesta natural a partir de los datos de la muestra. Los datos deben contener un caso que represente el nivel de control, para el cual el valor de las covariables sea 0. Probit estima el índice de respuesta natural utilizando como valor inicial la proporción de respuestas para el nivel de control.

5.10.5.6 VALOR.

Establece el índice de respuesta natural del modelo (seleccione este elemento cuando conozca de antemano el índice de respuesta natural). Introduzca la proporción de respuesta natural (la proporción debe ser menor que 1). Por ejemplo, si la respuesta ocurre el 10% de las veces cuando el estímulo es 0, introduzca 0,10.



5.10.6 CRITERIOS.

Permite controlar los parámetros del algoritmo iterativo de estimación de los parámetros. Puede anular las opciones predeterminadas para N° máximo de iteraciones, Límite para los pasos y Tolerancia de la optimalidad.

Para especificar las opciones del análisis probit

Esta característica requiere la opción Regresión.

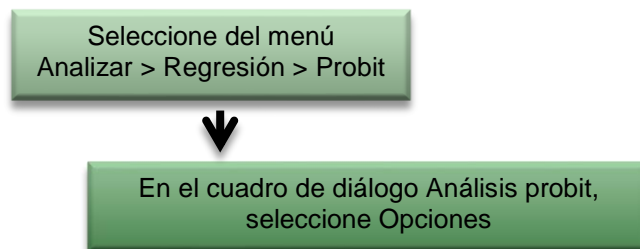


Fig 2. Criterios de Probit

5.10.7 SUPUESTOS.

Las observaciones deben ser independientes. Si dispone de un gran número de valores para las variables independientes respecto al número de observaciones, como es probable que suceda en un estudio observacional, puede que no sean válidos los estadísticos de chi-cuadrado y de bondad de ajuste.⁶⁹

5.10.8 PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS.

El análisis probit está estrechamente relacionado con la regresión logística; de hecho, si elige la transformación logit, este procedimiento calculará esencialmente una regresión logística. En general, el análisis probit es apropiado para los diseños experimentales, mientras que la regresión logística es más adecuada para los estudios observacionales. Las diferencias en los



resultados reflejan estas diferencias de énfasis. El procedimiento Análisis probit informa de las estimaciones de los valores efectivos para las diferentes tasas de respuesta (incluyendo la dosis efectiva para la mediana), mientras que la Regresión logística informa de las estimaciones de las razones de las ventajas (odds ratios) para las variables independientes.⁶⁹

5.11 EXPRESIÓN GÉNICA.

Los perfiles de expresión génica han tenido un gran impacto en nuestra comprensión de la biología del cáncer de mama y en la atención clínica. Recientes análisis han llevado al desarrollo de firmas de expresión génica, diseñados para predecir la supervivencia y/o respuesta al tratamiento, lo cual se ha traducido en el desarrollo de nuevos ensayos clínicos. Estas firmas biológicas incluyen firmas de acuerdo al tipo de célula que le dio origen, vías de señalización y proliferación celular. Se incluyen dentro de estas, los subtipos intrínsecos de cáncer de mama; lo cual pone de manifiesto el desempeño de biomarcadores de cáncer de mama como estándar de prevención.¹³

En esencia, existen dos metodologías para la valoración de los perfiles génicos: un perfil de expresión génica por medio de microarreglos de DNA, que requiere tejido congelado o fresco y el uso de RT-PCR para cuantificar la expresión de los genes seleccionados de manera prospectiva sobre el tumor.⁹



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO VI

MÉTODOS Y TECNICAS DE INVESTIGACIÓN EMPLEADAS



6. DISEÑO DEL ESTUDIO.

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO A EMPLEAR EN EL ESTUDIO.

6.1.1 Sangre total de sujetos de prueba provenientes de la zona del Estado de México. En el mes de Abril del 2017.

6.1.2 Suero de sujetos de prueba provenientes de la zona del Estado de México. En el mes de Abril del 2017.

NOTA: Se anexa el formato de la Carta Consentimiento Informado, por acuerdos de confidencialidad no se anexan las Cartas Consentimiento Informado de los sujetos de prueba.

6.2 TAMAÑO DE MUESTRA.

El estudio se realizara en pacientes procedentes del Estado de México, el tamaño de muestra se limita a 20 cultivos celulares, como control; es decir 20 sujetos de prueba.

6.3 VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
CITOTOXICIDAD	Toxicidad a nivel celular de cualquier xenobióticos, ya sea general u órgano-específica, afectando la funcionalidad de las células y con ello la muerte de las mismas.	Dependiente	Porcentaje de células muertas.	Cuantitativa, nominal



VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
BIS-TRIAZOL	Moléculas con núcleo de Triazol, el cual se refiere tanto a un par de compuestos químicos isoméricos con la fórmula molecular $C_2H_3N_3$, con 5 miembros de anillo de dos átomos de C y tres átomos de nitrógeno.	Dependiente	μM	Cuantitativa, nominal
CI50	La capacidad de medir con precisión la concentración del inhibidor que se requiere para inhibir una función biológica o bioquímica propuesta	Dependiente	Porcentaje de la concentración inhibitoria	Cuantitativa, nominal
CÁNCER	El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Un tumor maligno es un grupo de células cancerosas que pueden crecer (invadir) los tejidos o se pueden propagar (metástasis) a áreas distantes del cuerpo.	Independiente.	Grado.	Cualitativa, discreta
EDAD	Tiempo de existencia desde el nacimiento.	Independiente	Años	Cuantitativa, discreta
NF - kB	Factor nuclear Kappa B, es un factor celular transcripcional primario. Responsable de respuestas a señales extracelulares y con importancia en la respuesta inflamatoria e inmune, asociada al cáncer y metástasis.	Dependiente	CT	Cuantitativa, nominal

Tabla 2. Variables



6.4 CRITERIOS.

6.4.1 INCLUSIÓN.

Individuos que acepten voluntariamente participar en el protocolo de “Determinación de la CI50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol y su relación con NF - kB como blanco terapéutico en pacientes con cáncer de mama”.

Ser mayor de 18 años y menor de 65 años.

Peso corporal mayor de 50 Kg.

Mujeres no estar embarazadas, ni haber tenido embarazos en los últimos 6 meses, ni estar lactando.

No es motivo de exclusión de las mujeres que se encuentren en período menstrual, a menos que cursen con cualquier síntoma asociado.

No saberse enfermo al momento de la donación.

6.4.2 EXCLUSIÓN.

Pacientes de sexo masculino y mujeres que no acepten firmar la carta de consentimiento informado.

6.5 COLECTA DE MUESTRAS.

6.5.1 Selección de sujetos de prueba, los cuales deben de cumplir con todos los parámetros indicados dentro de los criterios de inclusión.

6.5.2 Leer la carta consentimiento y la información del proyecto.

6.5.3 Colectar las firmas correspondientes, verificando que la información sea clara y concisa para el sujeto de prueba y testigo.

6.5.4 Identificación del tubo de EDTA K2 con anticoagulante para análisis de sangre total y/o plasma, con el nombre completo del sujeto de prueba, así como el folio asignado por el investigador, de manera indeleble y al momento.

6.5.5 Mostrar las agujas vacuatiner al sujeto de prueba, la cual debe estar estéril y sellada.



6.5.6 Insertar la aguja al holder.

6.5.7 Colocar liga para presionar el brazo del sujeto de prueba.

6.5.8 Proceder a la punción venosa. Se obtuvieron 20 mL de sangre con EDTA al 10 %, recolectada en tubos de sistema vacutainer (Becton Dickinson), de la vena cubital

6.5.9 CONSIDERAR LOS SIGUIENTES ASPECTOS

Es importante mencionar que la sangre total debe de contar con características como estar libre de partículas extrañas ajenas a un indicativo de buena salud de la sangre.

Homogenizar la muestra sanguínea. Resguardar la muestra bajo condiciones de refrigeración.

Normas de Laboratorio para cultivo celular, las cuales consisten en algunos de estas consideraciones:

6.5.9.1 Realizar la limpieza de los equipos e instrumentos ocupados para los cultivos celulares y manipulación de las muestras. Se realiza la limpieza con alcohol al 70%.

6.5.9.2 El personal que ejecute la manipulación de las muestras así como los cultivos celulares debe estar capacitado.

6.5.9.3 El personal que ejecute la manipulación de las muestras así como los cultivos celulares debe seguir la técnica de lavado de manos correctamente, usar equipo de protección personal (EPP), que incluye la bata, zapatos cerrados, lentes de seguridad, cubrebocas, libre de maquillaje así como joyas, uñas cortas y cabello recogido.

6.5.9.4 Verificar que el material se encuentre estéril tales como pipetas, puntas, etc. El material estéril sólo puede abrirse, lógicamente, dentro de la campana de cultivos, el material que no se tenga certeza de su esterilidad no usar.



- 6.5.9.5 Al existir contaminación se considera como un resultado fuera de especificación por ello se levantara una investigación buscando la causa-raíz, así mismo delimitando un análisis de riesgo para tener acciones correctivas y preventivas ante tales resultados.
- 6.5.9.6 El analista que ejecute el cultivo celular y detecte la contaminación debe informar al responsable del laboratorio.
- 6.5.9.7 Identificar de manera indeleble y al momento las cajas roux en la tapa y en un lateral de la caja.
- 6.5.9.8 Colocar un stock mínimo de un frasco de solución evitando la contaminación de las muestras y de los reactivos, así como soluciones.
- 6.5.9.9 Clasifique los desechos de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- 6.5.9.10 Realizar los registros en las bitácoras de los equipos y/o instrumentos del Laboratorio de manera indeleble, al momento, realizando actividades trazables.

6.6. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

6.6.1 MEDIO RPMI-1640.

Atemperar el polvo del medio de cultivo.

Medir 800 mL de agua tipo II (Tridestilada) a una temperatura de 15-20°C y colocarlos en el matraz volumétrico clase A.

Pesar 10.4 g y transferir lentamente a un matraz volumétrico clase A.

Agitar constantemente, no calentar el agua.

Adicionar 2.0 g de bicarbonato de sodio al 5.6% por litro.

Adicione Penicilina (100 U/mL) / Estreptomicina (100 µg/mL). Combinación anti-microbiana.

Ajustar el pH a 7.4 con solución de Ácido clorhídrico 0.1 N e Hidróxido de Sodio 0.1 N.



Aforar a 1.0 L con agua purificada tipo 2.

Esterilizar por filtración con membranas de 0.22 μm , utilizando presión positiva.

Conservar en refrigeración cubierto de papel parafilm.

NOTA: No usar el medio si se cuenta con un aspecto naranja, lo cual es indicativo de inestabilidad. Conservar de 2 a 6 °C, la vigencia y caducidad de dicha solución es de 12 meses.

6.6.2 ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.1 N

En un matraz volumétrico de 100 mL, depositar 200 mL de agua, agregar lentamente 85 mL de ácido clorhídrico. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua.

NOTA: Realizar el ajuste con la densidad y pureza que viene en la etiqueta del proveedor.

6.6.3 HIDRÓXIDO DE SODIO 0.1 N

En un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver 4.2 g de hidróxido de sodio en agua libre de dióxido de carbono. Llevar a volumen con el mismo disolvente.

6.6.4 AGUA LIBRE DE DIÓXIDO DE CARBONO

Colocar en un vaso de precipitado 2 L de agua purificada nivel 1.

Coloque perlas de ebullición.

Hervir por 5 minutos.

Colocar papel aluminio para tapar el vaso de precipitado.

Atemperere, cuidar de no destapar el vaso de precipitados hasta que se use, con ello se evita la captura de dióxido de carbono.

6.6.5 ALCOHOL 70 % (V/V)

Colocar 700 mL de alcohol anhidro absoluto en una probeta de 1000 mL. Llevar a volumen con agua purificada tipo 2.

6.6.6 MEDIO DE CONSERVACIÓN 1

Colocar medio de crecimiento RPMI-1640 con 2 veces la concentración normal de suero y glicerina.



6.6.7 MEDIO DE CONSERVACIÓN 2

Realizar una solución del 5-10 % de DMSO (v/v) con medio de cultivo RPMI-1640.

6.6.8 PBS 10X.

Pesar 80.0 g de Cloruro de sodio (NaCl), 2.0 g de Cloruro de Potasio (KCl), 14.4 g de Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), 2.4 g de Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4).

Disolver las sales anteriormente mencionadas en 800mL de agua purificada tipo 2.

Ajustar el pH de la solución previamente elaborada a 7.4 con Ácido Clorhídrico 0.1 N e Hidróxido de Sodio 0.1 N.

Aforar a 1.0 L con agua purificada tipo 2.

6.6.8.1 PBS 1X.

Transferir 100 mL de PBS 10X.

Aforar a 1.0 L con agua purificada tipo 2.

Nota: Es importante mencionar que todas las soluciones a utilizar deben presentar una apariencia cristalina, si se observa turbidez o contaminación microbiana **NO UTILIZAR** para el análisis aunque se encuentre dentro de su fecha de Vigencia (2 días de vigencia).⁷¹

6.6.9 AZUL DE TRIPAN AL 0.85% (v/v)

Pesar 0.85 g de colorante azul de tripan.

Colocar en un matraz volumétrico clase A de 100 mL.

Adicionar alcohol anhidro absoluto, agitar constantemente y aforar.

Filtrar con papel Whatman 41.

NOTA: La vigencia de esta solución es de 24 horas, ya que es una solución con alcohol.

6.7 PROCEDIMIENTO.

6.7.1 CONSIDERACIONES IMPORTANTES ANTES DE INICIAR CON EL ANÁLISIS.⁷⁰

6.7.1.1 Atemperar el Medio de cultivo RPMI-1640.



6.7.1.2 Limpiar la campana de flujo laminar con alcohol al 70%. Encender la luz UV 30 min antes de su uso y después de su limpieza y uso.

6.7.1.3 Atemperar las muestras sanguíneas.

6.7.1.4 Verificar que las muestras no estén hemolizadas.

6.7.2 CULTIVO CELULAR DE LEUCOCITOS

6.7.2.1 Eliminar los eritrocitos de la muestra de sangre total por medio de una solución de lisis 100µL PBS 1X, centrifugar por 2 minutos en tubo eppendorf a 3500 rpm, eliminar el sobrenadante con pipeta de 5µL.

6.7.2.2 Repetir el paso anterior hasta observar una solución incolora, sin restos de eritrocitos.

6.7.2.3 Colocar 10 mL de Medio de cultivo RPMI-1640 en la caja roux de poliestireno con superficie tratada no ventilada sin membrana 25 cm².

6.7.2.4 Etiquetar de manera indeleble y al momento las cajas Roux, colocando el nombre y folio correspondiente.

6.7.2.5 Colocar el paquete celular en la caja Roux con medio de cultivo RPMI-1640 previamente adicionado.

6.7.2.6 Colocar los tubos eppendorf con la muestra, en la incubadora SL Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc, a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂.

6.7.2.7 Después de 24 horas de incubación evaluar el crecimiento celular, por medio de recuento celular de manera manual, es decir por medio de una Cámara Neubauer tomando en cuenta que la muestra no se procesa con dilución.

6.7.3 CALCULO DE LEUCOCITOS/ μ L SIN DILUCIÓN.

$$\text{Células por } \mu\text{L volumen} = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad cámara (mm)}}$$

Fórmula 1. Conteo de leucocitos sin dilución.

$$\text{Células por } \mu\text{L} = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad cámara (mm)} * \text{dilución}}$$

Fórmula 2. Conteo de leucocitos con dilución.



Fig 3. Cámara Neubauer

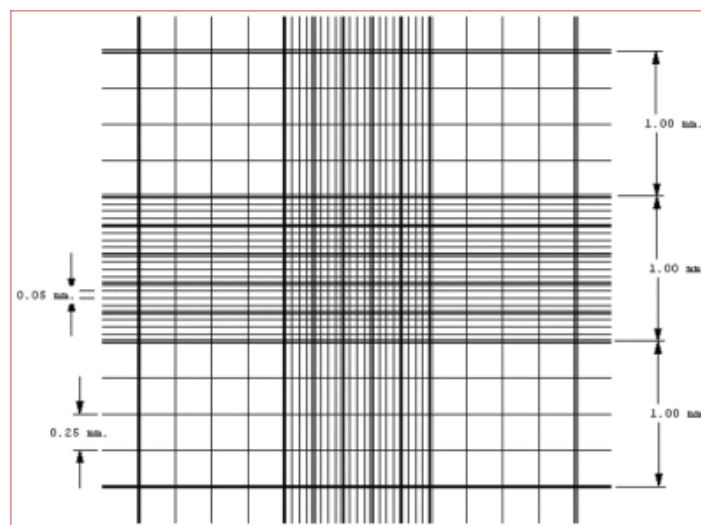


Fig 4. Cuadrantes de Cámara Neubauer

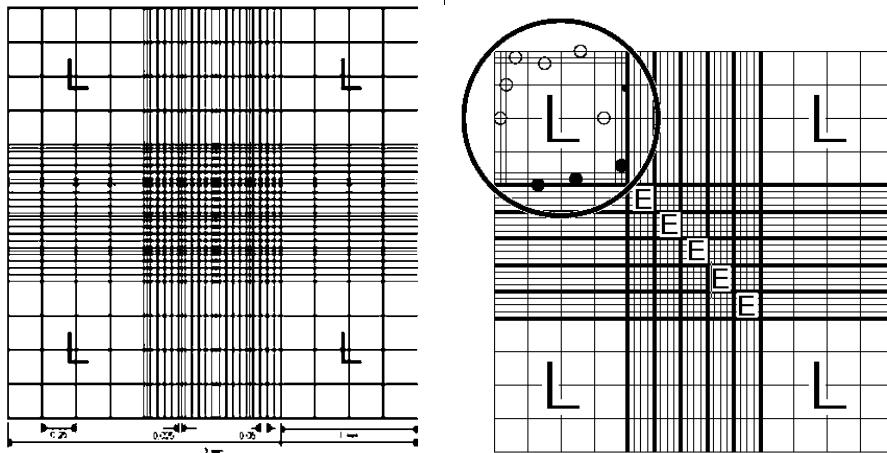


Fig 5. Conteo de Leucocitos

La cuadrícula de recuento muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm². Los 4 cuadrados grandes de las esquinas señalados con una "L" están divididos en 16 cuadrados con aristas de 0,25 mm. Se utilizan para el recuento de leucocitos.⁷³

6.7.3.1 Si se observa que la muestra no presenta suficiente crecimiento mantenerla en incubación por 48 horas más, si el crecimiento no es favorable eliminar la muestra. El cultivo debe cumplir 72 horas para el crecimiento celular apropiado.

6.7.3.2 Obtener una densidad de 3×10^3 células y colocar este contenido en un nuevo tubo eppendorf, realizarlo por triplicado por cada muestra.

6.7.3.3 Realizar 6 diluciones de la mezcla madre del 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2-propanolol, para obtener una concentración de 1.5 μ M, 7.5 μ M, 15 μ M, 37.5 μ M, 75 μ M, 150 μ M, el diluyente es el medio de cultivo RPMI-1640.

6.7.3.4 Colocar las proporciones de las diluciones en cada tubo eppendorf con la concentración de células indicada. Incubar por 24 horas con una temperatura de 37°C con 5% de CO₂.

Las cámaras de recuento se utilizan para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido. Las partículas leucocitos, eritrocitos, trombocitos, bacterias, esporas,



polen etc. se cuentan visualmente con un microscopio. Las cámaras de recuento BLAUBRAND® son instrumentos de precisión para medición. ⁷³

La placa base en vidrio óptico especial tiene el tamaño de un portaobjetos. Las ranuras fresadas en la superficie de la placa base la dividen en dos zonas anchas exteriores y 3 campos pequeños interiores. A diferencia de las zonas exteriores, que se utilizan para rotulación, los campos interiores están esmerilados y pulidos. En el campo central (= fondo cámara) están grabadas dos cuadrículas de recuento separadas una de otra por una ranura. El fondo de la cámara del campo central es usualmente 0,1 mm más bajo (= profundidad cámara) que ambos campos adyacentes. Entre campo central y cubreobjetos ya colocado existe por tanto una ranura de 0,1 mm. La limitación lateral del volumen a contar se forma mediante las superficies imaginadas por la proyección vertical sobre las líneas exteriores de la cuadrícula de recuento. ⁷³

6.7.4 MÉTODO DE TINCIÓN POR EXCLUSIÓN.

6.7.4.1 En un tubo estéril colocar 0.8 mL de suspensión celular y añadir 0.2 mL del colorante azul de Tripan.

6.7.4.2 Dejar reposar por 3 minutos.

6.7.4.3 Colocar 10 μ L de la mezcla anterior en la cámara de Neubauer.

6.7.4.4 Observar al microscopio en 10x, 20x, 40x, contar los cuatro cuadrantes primarios de las esquinas de la cámara y realizar los cálculos necesarios: Ver Fórmulas (1 - 3).

6.7.4.5 Contar por separado a las celular azules (muertas) y a las celulas blancas (vivas) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.

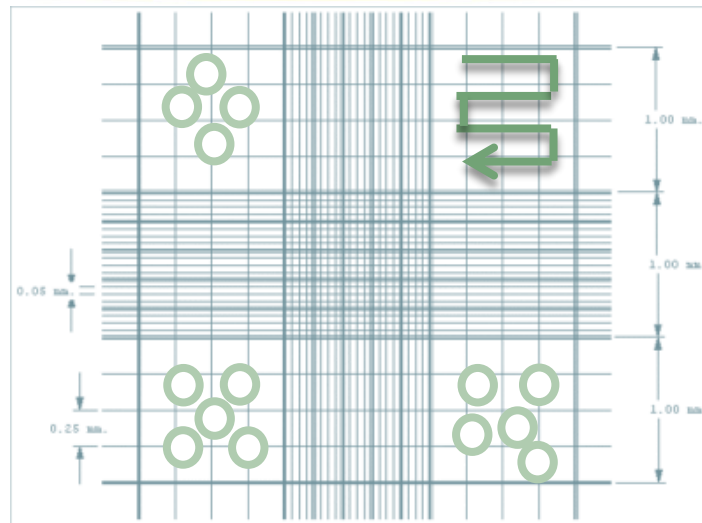


Fig 6. Conteo de los cuadrantes de leucocitos.

6.7.5 ENSAYO DE RESPUESTA CUANTAL.

6.7.5.1 Realizar en análisis Probit, para determinar el punto final del 50 por ciento de una preparación (CI50).

6.7.5.2 Tabular el valor de la dosis, el logaritmo de la dosis, número de reactores para cada dosis. Determinar el porcentaje de muerte celular. Ingresar datos en hoja de cálculo de IBM SPSS Versión 22. Seleccionar analizar Regresión Probit.

6.7.5.3 Establecer una relación de la respuesta cuantál determinada por medio del método estadístico Probit, usando IBM SPSS Versión 22, cumpliendo con los parámetros señalados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Undécima edición 2014 (Ensayos de respuesta Cuantál) y de la misma manera de la USP (Design and development of biological assays).

6.7.6 FÓRMULAS

$$\text{Células por } \mu\text{L} = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad cámara (mm)}}$$

6.7.6.1 Conteo de leucocitos sin dilución.



$$\text{Células por } \mu\text{L} = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad cámara (mm)} * \text{dilución}}$$

6.7.6.2 (Cuadros 4x4) células por mL.

Células por mL x Volumen mL

6.7.6.3 Células totales.

$$\frac{\text{Número de células vivas totales}}{\text{Número de células totales (vivas + muertas)}} \times 100$$

6.7.6.4 Viabilidad celular.

6.7.7 OBTENER UN ANÁLISIS PROBIT

6.7.7.1 ESTA CARACTERÍSTICA REQUIERE LA OPCIÓN REGRESIÓN.

La variable de frecuencia indica el número de casos que presentan una respuesta al estímulo de prueba. Los valores de esta variable no pueden ser negativos.

La variable para el total observado indica el número de casos a los que se aplicó el estímulo. Para cada caso, los valores de esta variable no pueden ser negativos ni menores que los valores de la variable de frecuencia de respuesta. Si se desea, puede seleccionarse una variable de factor. Si lo hace, pulse en Definir rango para definir los grupos.

La covariable contiene el nivel del estímulo aplicado en cada observación. Si desea transformar la covariable, seleccione una transformación de la lista desplegable Transformar. Si no se aplica ninguna transformación y hay un grupo de control, éste se incluirá en el análisis.

6.7.7.1.1 Modelo Probit.



Aplica la transformación Probit (la inversa de la función acumulada de la distribución normal estándar) a las proporciones de respuesta.

6.7.7.1.2 Modelo Logit.

Aplica la transformación logit (log de la probabilidad) a las proporciones de respuesta.

Este procedimiento pega la sintaxis del comando PROBIT. En este caso el análisis que se realiza es análisis Probit para intereses de dicho experimento.

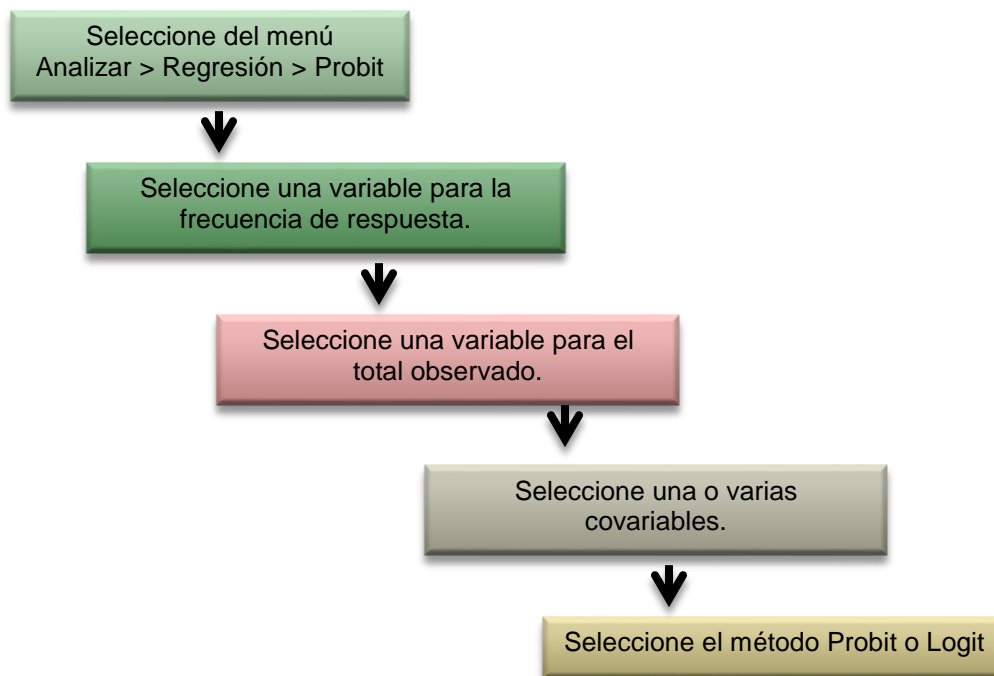


Fig 7. Análisis Probit

6.7.7.2 DEFINIR UN RANGO EN EL ANÁLISIS PROBIT.

Permite especificar los niveles de la variable de factor que serán analizados. Los niveles de factor deben codificarse como enteros consecutivos; se analizarán todos los niveles del rango que especifique.

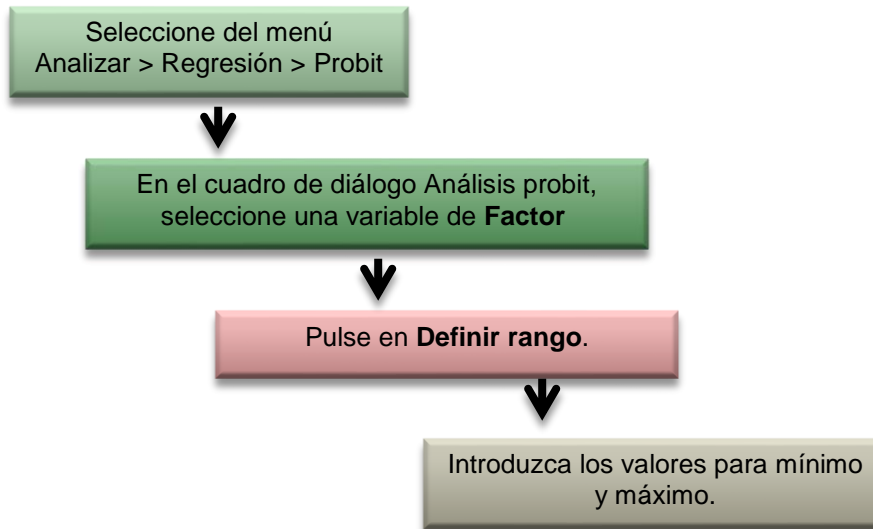


Fig 8. Definición de rango



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO VI

PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



7.1 RESULTADOS DE INDICE DE MASA CORPORAL

FOLIO	ÍNDICE DE MASA CORPORAL
001	27.40
002	26.76
003	30.25
004	28.76
005	28.58
006	29.01
007	34.31
008	23.33
009	28.90
010	23.33
011	22.44
012	25.99
013	30.36
014	31.99
015	34.49
016	29.79
017	35.00
018	23.53
019	28.84
020	29.82

Tabla 3. Índice de masa corporal



ÍNDICE DE MASA CORPORAL	
INSUFICIENCIA PONDERAL	< 18.4
NORMAL	18.5 – 24.9
SOBRE PESO	25-29.9
OBESIDAD I	30-34.9
OBESIDAD II	35-39.9
OBESIDAD III	≥ 40

Tabla 4. Índice de masa corporal

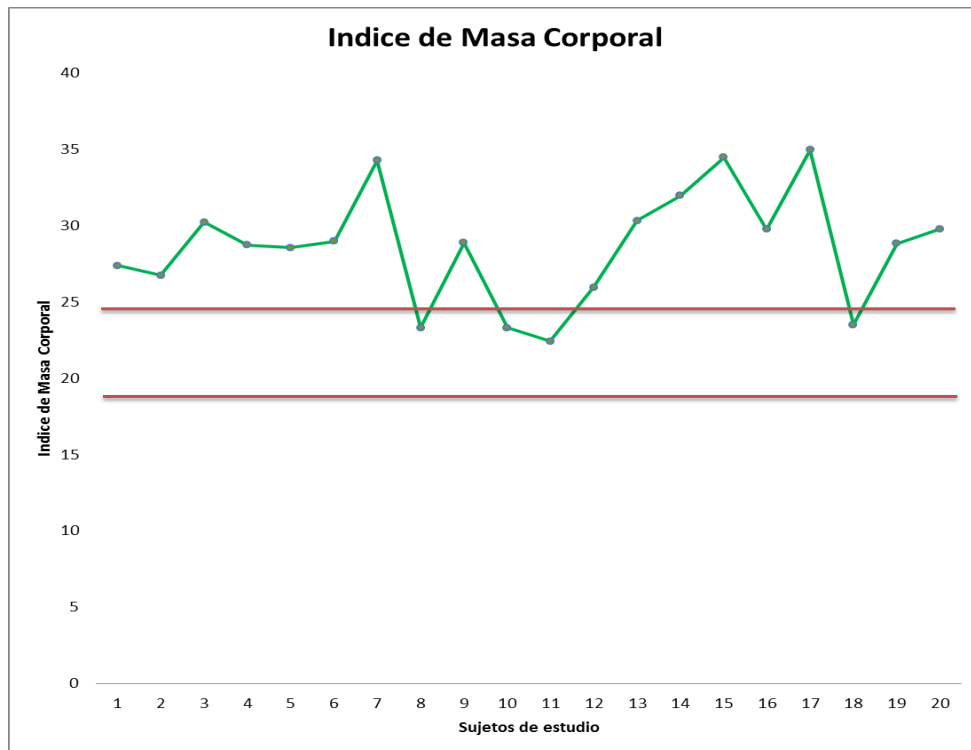


Grafico 1. Se observa el límite inferior y el límite superior de los valores de peso normal.

Se observa que los individuos muestran en la mayoría sobre peso, es decir 12 sujetos de estudio, lo cual es proporcional al 60 % de la población total, el tener este aumento de peso influye en la respuesta inmunológica, ya que el cuerpo presenta estadios de inflamación y con ello propicia las anormalidades en el crecimiento celular. Por ello en este estudio se estableció la relación de expresión génica de NF-KB, a pesar de que no se estableció la relación en las



muestras utilizadas de este gen, se encuentran publicaciones las cuales demuestran la relación entre el sobrepeso con el aumento de la expresión de este gen.

Caber mencionar que refiriendo al cuestionario realizado se encuentra que el es indistinto el estado civil, lugar de residencia y ocupación. La edad en la que los sujetos de estudio presentan las fluctuaciones de peso son jóvenes, comprendiendo el rango de edad establecido en el protocolo de este estudio.

La cantidad de sujetos con peso normal es muy pequeña, la cual es de 4 sujetos de estudio, equivalente al 20 % de la población total, lo cual es igual a la cantidad de sujetos con obesidad tipo I.

7.2 RESULTADOS OBTENIDOS DEL CULTIVO CELULAR.

7.2.1 SOLUBILIDAD DEL COMPUESTO.

Se determinó la solubilidad del compuesto obteniendo los siguientes resultados:

1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol (g)	SOLVENTE	CANTIDAD (mL)	RESULTADO
0.0010	DMSO	1.5	Soluble
0.0011	Agua Milli Q	1.5	Poco soluble
0.0011	Agua Milli Q	1.4	Precipita
	DMSO	0.1	
0.0012	DMSO	0.1	Ligera precipitación
	RPMI	1.4	
0.0011	Isopropanol	1.5	Insoluble
0.0012	N,N-dimetilformamida	1.5	Soluble

*Dimetilsulfóxido (DMSO).

Tabla 5. Solubilidad del compuesto



Por ello se determinó experimentalmente que se debe realizar un stock de triazol con DMSO y hacer diluciones, aforando con el diluyente, la cantidad de DMSO debe ser menor al 10% del volumen total para no generar toxicidad, que influya en el cultivo celular debido al DMSO.

Se determina usar Dimetilsulfóxido (DMSO) ya que es una gente que ayuda a cambiar la polaridad de compuestos y soluciones que no son polares, ya que el un disolvente aprótico y altamente polar, por ello es miscible con el agua como en disolventes orgánicos como alcoholes, cetonas, etc. Puede formar complejos con sistemas biológicos, ayudando como protector y conservador.

El Dimetilsulfóxido (DMSO) en los cultivos celulares, funge como crioconservador, los cuales protegen a la célula por los siguientes mecanismos como la eliminación de sales, bajar la temperatura, reduciendo la fracción de la solución congelada, minimizando la formación de hielo intracelular. El dimetilsulfóxido es un crioconservante intracelular con bajo peso molecular que hacen permeables a las células, se usa en concentraciones entre 0.5 M y 3 M, minimizando el daño celular en 50 % v/v.

Por lo antes mencionado basándonos en la clasificación Biofarmacéutica (BCS: Biopharmaceutics Classification System), la cual a continuación se menciona, se determina exclusivamente por la solubilidad y la permeabilidad, así como el tiempo de disolución "*in vitro*". Este sistema es funcional para desarrollar formas farmacéuticas por diseño de matriz, sin embargo para este estudio se utilizara para predecir el comportamiento de compuestos azoles, de acuerdo a la base de datos de la BCS, moléculas azoles como el Itraconazol, es una base débil, que tiene una solubilidad muy baja en agua, y una alta permeabilidad, lo que lo hace perteneciente a la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de la solubilidad, se observa que es poco soluble en agua, por ello se requiere de un compuesto que ayude a proporcionar polaridad a la solución y con ello solubilizar el compuesto, por ello se utiliza el Dimetilsulfóxido (DMSO). En este caso de acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de la Concentración Inhibitoria 50 se observa la permeabilidad en las células a bajas concentraciones, por ello se determinaría una clasificación biofarmaceutica II, baja solubilidad, alta permeabilidad.



Se realizó la extracción de sangre periférica de los sujetos de estudio, los cuales firmaron la carta de consentimiento informado y de la misma manera respondieron un cuestionario referente a datos de interés para el estudio.

Se realizó el cultivo celular en cajas Roux y con medio RPMI previamente preparado bajo las directrices planteadas en este ensayo. Los medios de cultivo en algunos casos se observaron con coloración rojiza y en otros casos con una coloración magenta oscuro, como se observa en la imagen 1 y 2.

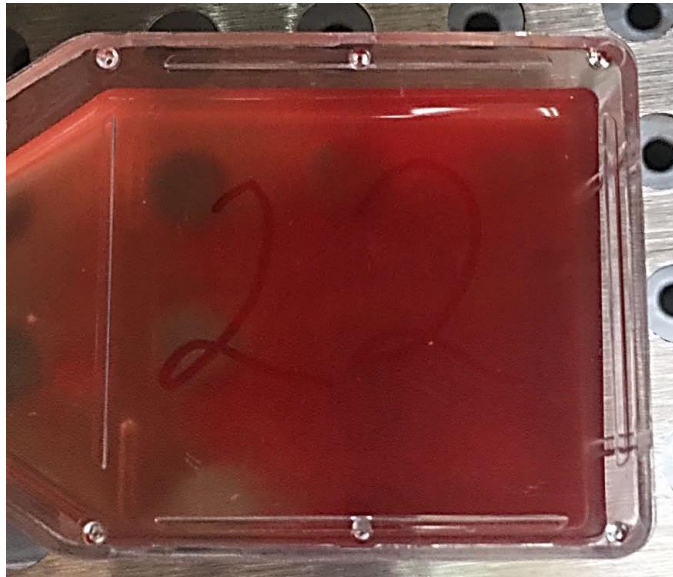


Imagen 1. Medio de cultivo

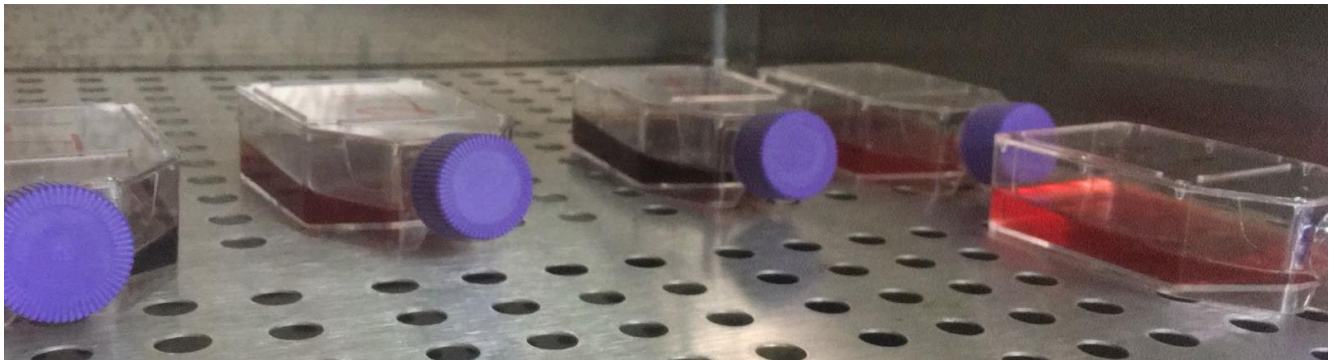


Imagen 2. Incubación de medios de cultivo dos de ellos descartados por presencia de RBC.

El medio de cultivo se cambió en cultivos que tardaron en presentar crecimiento celular, este cambio de medio de cultivo se realizaba verificando que no se encontrara turbio y/o partículas que fueran indicativo de contaminación.

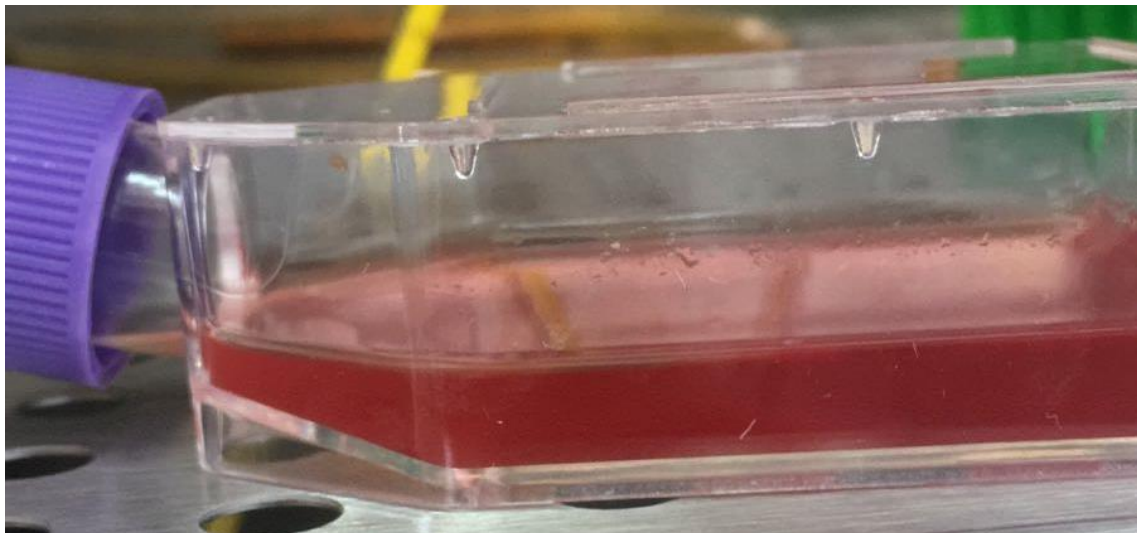


Imagen 4. Cambio de medio de cultivo RPMI-1640



Imagen 5. Alícuotas de muestras de medio de cultivo de uso y descarte, la muestra de la izquierda presenta RBC por ello se descarta ese cultivo por interferencia.

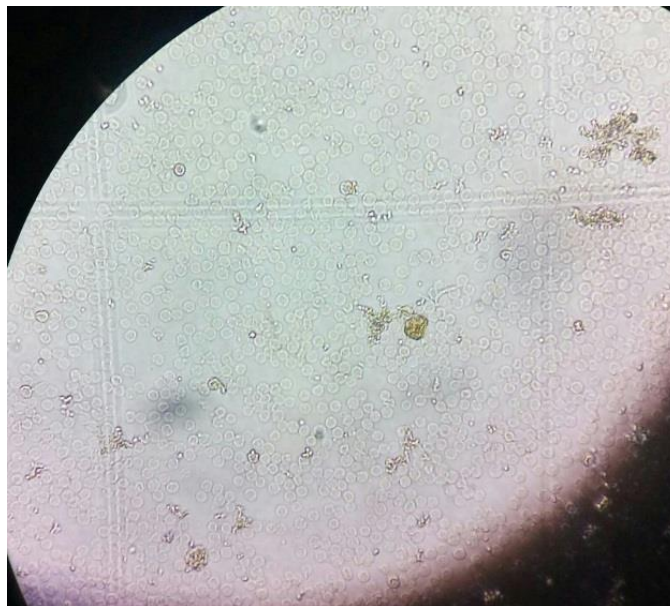


Imagen 6. Presencia de RBC en cultivos sin lisis adecuada, objetivo 100X.

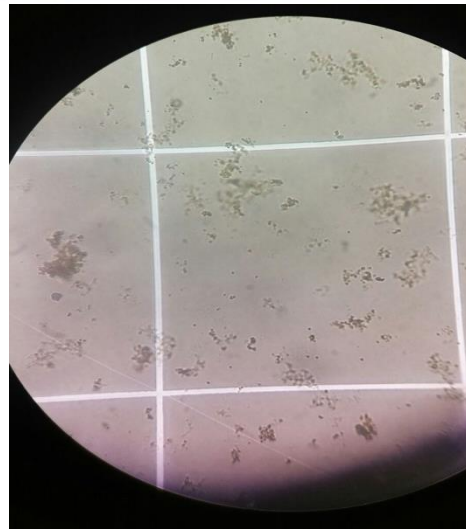


Imagen 7. Ausencia de crecimiento celular, objetivo 100X.

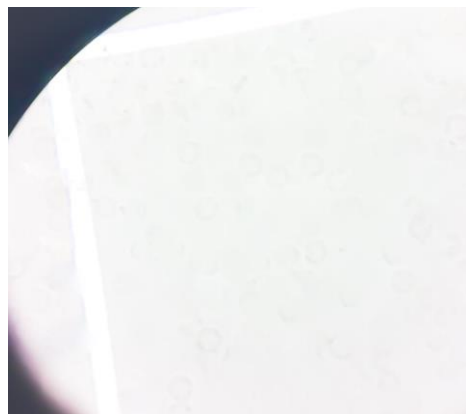


Imagen 8. Crecimiento celular, sin diluciones objetivo 100X.

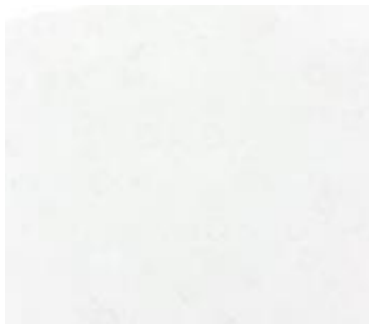


Imagen 9. Crecimiento celular, con dilución objetivo 100X.

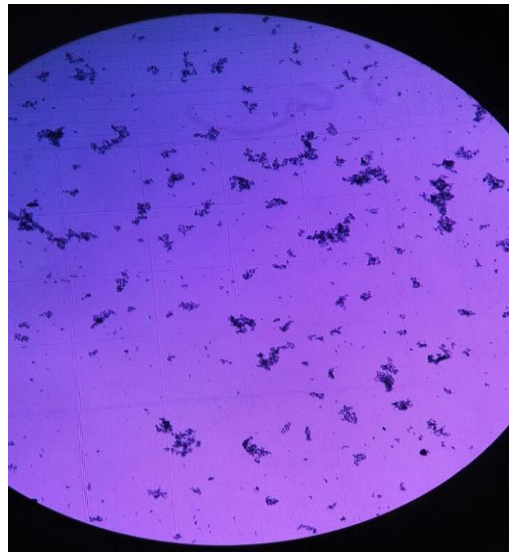


Imagen 10. Azul de tripano cristalizado, con dilución objetivo 100X

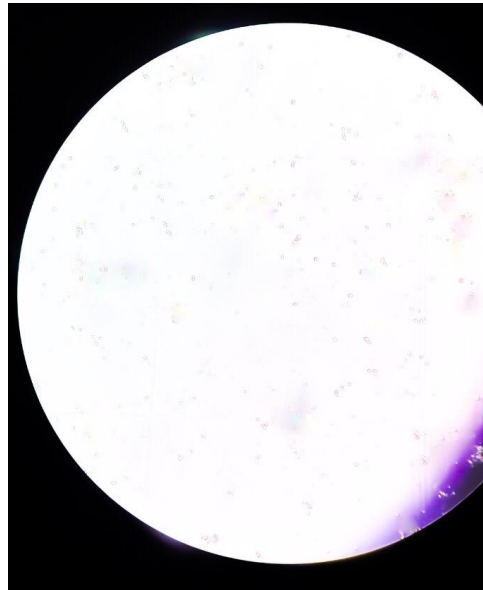


Imagen 11. Conteo de diferenciación con azul de tripano, con dilución objetivo 100X

Los cultivos celulares, mostraron crecimiento adecuado, a pesar de las partículas en las muestras debidas al azul de tripano, se muestran las células muertas y las células vivas. Los cultivos que mostraron contaminación se eliminaron del estudio, ya que no se cultivó selectivamente los linfocitos.



Se tomaron 23 muestras de sujetos que accedieron a participar de manera voluntaria al estudio, siendo conscientes de su beneficio y probables inconvenientes, los cuales están descritos en la carta consentimiento documentada en el siguiente escrito. En el cultivo celular se descartaron 2 cultivos celulares (Folio 22 y 23), ya que contaban con presencia de Eritrocitos (RBC), Ver Imagen 6; así mismo se observó ausencia de crecimiento celular en el Folio 21. Ver Imagen 7.

Se observa que la corrida de muestras con lisis y sembradas en el mismo día, presento inconvenientes, lo cual se atribuye a la preparación de la solución PBS 10X para el caso de los cultivos con Folio 22 y 23, ya que la concentración de las sales disminuyo de acuerdo a lo indicado, evitando con ello la lisis de los eritrocitos (RBC). Ver Imagen 5. Por ello por medio de este resultado se obtiene la vigencia experimental de la solución de PBS 10X, ya que al tener una concentración alta de Fosfatos y bajo condiciones ambientales se cristalizó obteniendo alteración en la cantidad de sales. Por ello cada solución de PBS 10X debe ser preparada el día de su uso, adicionalmente evitar el contacto de la solución con alcoholes, por ejemplo metanol y con corrientes directas de aire; para evitar la precipitación de las sales.

De la misma manera al tener presencia de Eritrocitos (RBC) el medio de cultivo vira de color de un rosa a un marrón, lo cual es indicativo de cambio de pH, ya que las condiciones para el crecimiento de Linfocitos no es el indicado. Ver Imagen 2 y 5.

Para el caso del cultivo correspondiente al Folio 21, no se observó crecimiento celular, lo cual nos referencia a la afirmación que las células no pueden crecer en un medio de cultivo indefinidamente, lo cual se debe al consumo de los nutrientes y con ello la generación de impurezas, es decir productos tóxicos. Por tratarse del último cultivo celular se hace referencia a tal aseveración.

Dicho cambio se observó en los cultivos que sirvieron para el estudio, ya que al generarse productos tóxicos las células se alteran y llega el momento en que la densidad celular terminada a causa de una inhibición del crecimiento, por ello se procede a cambiar el medio de cultivo por recién preparado para obtener un crecimiento celular favorable y con ello una densidad celular adecuada. Ver Imagen 4.



Cuando las células están en suspensión, es necesario llevar a cabo un proceso de subcultivar para conservarlas, en el caso de suspensiones como en este estudio, una vez alcanzada la alta densidad y antes de que el medio se acidifique en exceso, se deben centrifugar, contadas y resembradas a la densidad adecuada según el tipo celular en un medio fresco con la misma temperatura, sin embargo para este experimento no se realizó dicho proceso, ya que no es uno de los objetivos del estudio.

Es importante mencionar que el proceso de lisis solo se realizó con PBS 10X y PBS 1X, ya que al usar agentes como la tripsina no se estandarizó la cantidad para sangre periférica y se mataban las células. Además el uso de la tripsina al levantar las células adherentes la mayoría de las proteínas de la membrana se pueden eliminar, lo cual no hace específico el método de cuantificación de células ya que el principio de la tinción del Azul de Tripano sigue en la misma dirección.

Sin embargo para las muestras con las cuales se ejecutó el análisis de NFκB al tratarse de tejido celular, se procedió a usar tripsina como agente de digestión, ya que el principio del método biológico lo amerita.

Para este experimento se realizó el cultivo celular con leucocitos ya que representan la mayor fuente de DNA, lo cual es funcional para estudios de citotoxicidad *“in vitro”* así como el estudio en co-relación (Expresión génica). Lo principal es extraer los núcleos de los leucocitos, los cuales por medio de la centrifugación sin destrucción enzimática, son suficiente volumen de sangre como 10mL a 30mL, es importante ser colectados con EDTA, para tener la integridad de la muestra, con la obtención de los núcleos y/o células de leucocitos se obtienen grandes cantidades de DNA, en fragmentos superiores a 20kb, con ello es una fuente viable de muestras para ensayos de Biológicos.

Para el conteo celular se emplea el Azul de tripano, al ser una solución alcohólica y al evaporarse se forman cristales, evitando la observación de células, tal y como se muestra en la Imagen 9. En este caso solo se repitió colocar nueva alícuota de la muestra con el colorante recién preparado, ya que solo afectó la preparación de la muestra en la lectura, tomándolo como error independiente y no como error sistemático.



Se observaron muestras definidas para este estudio como células viables refiriéndonos a las células vivas y las células no viables refiriéndonos a las células muertas. El azul de tripano es capaz de teñir a tejidos y células muertas, se observa en la Imagen 10 un aspecto con coloración rosa, se procedió a realizar antes de leer cada muestra la iluminación de Köler, obteniendo los mismo resultados, de la misma manera al tratarse de un colorante se puede modificar la tinción por cambio de pH, sin embargo una vez hecha la mezcla de suspensión de células con el azul de tripano, se verifico el pH del mismo obteniendo resultados de 7.42, obteniendo valores dentro del rango de variación ± 0.02 unidades de variación, determinando el valor de pH a $25 \pm 2^\circ\text{C}$; siguiendo el Método General de Análisis de Medición de pH MGA 0701. FEUM, Undécima edición 2014.

Por lo antes mencionado se determina la confiabilidad y trazabilidad en el conteo celular, ya que método cuenta con tolerancia y robustez.



7.3 CONTEO DE CÉLULAS

7.3.1 CÉLULAS VIABLES

Log Conc	0.2
CULTIVO 01	48
CULTIVO 02	46
CULTIVO 03	45
CULTIVO 04	48
CULTIVO 05	49
CULTIVO 06	49
CULTIVO 07	49
CULTIVO 08	46
CULTIVO 09	49
CULTIVO 10	46
CULTIVO 11	46
CULTIVO 12	49
CULTIVO 13	48
CULTIVO 14	48
CULTIVO 15	48
CULTIVO 16	44
CULTIVO 17	48
CULTIVO 18	47
CULTIVO 19	47
CULTIVO 20	45
PROMEDIO	47.3
D.E	1.6
C.V.	3.3
MÁXIMO	49
MINIMO	44

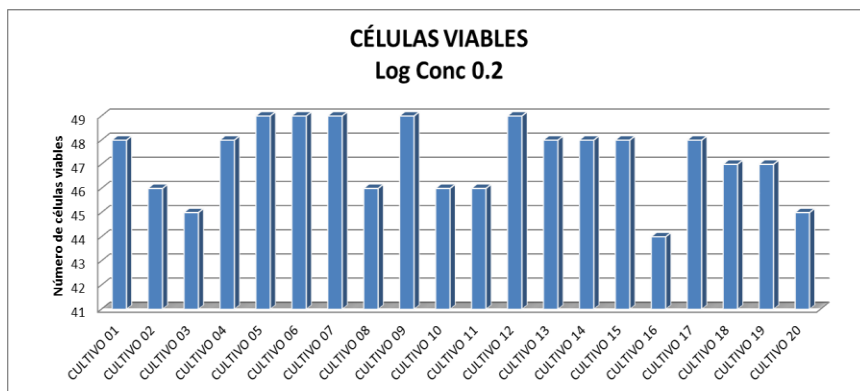


Gráfico 1. Células viables Log Con 0.2

Tabla 5. Células viables Log Con 0.2

En estos cultivos de prueba se observo que los números de células vivas son homogéneos, mostrando un C.V menor a 5.0 % lo cual se hace referencia en guías de bioensayos, cabe mencionar que previo a este conteo se realizó una cuenta de células de los cultivos sin dilución, arrojando resultados de grandes cantidades de células, por ello se realizo un dilución homogenizando la cantidad de células en los cultivos celulares, para delimitar la cantidad de células presentes en las muestras y con ello presentar proporcionalidad en la prueba, con ello obtener resultados confiables, por ello los resultados se muestran con un coeficiente de variación menor al 5%. En la concentración de log 0.2, se observan fluctuaciones en las células viables, es decir vivas, se observa que en este logaritmo de concentración el índice de células vivas es alto, ya que se refiere a la concentración de 1.5 µM.



Log Conc	0.9
CULTIVO 01	45
CULTIVO 02	28
CULTIVO 03	42
CULTIVO 04	41
CULTIVO 05	45
CULTIVO 06	46
CULTIVO 07	45
CULTIVO 08	43
CULTIVO 09	43
CULTIVO 10	43
CULTIVO 11	43
CULTIVO 12	47
CULTIVO 13	47
CULTIVO 14	45
CULTIVO 15	45
CULTIVO 16	40
CULTIVO 17	40
CULTIVO 18	45
CULTIVO 19	46
CULTIVO 20	41
PROMEDIO	43.0
D.E	4.1
C.V.	9.6
MÁXIMO	47
MINIMO	28

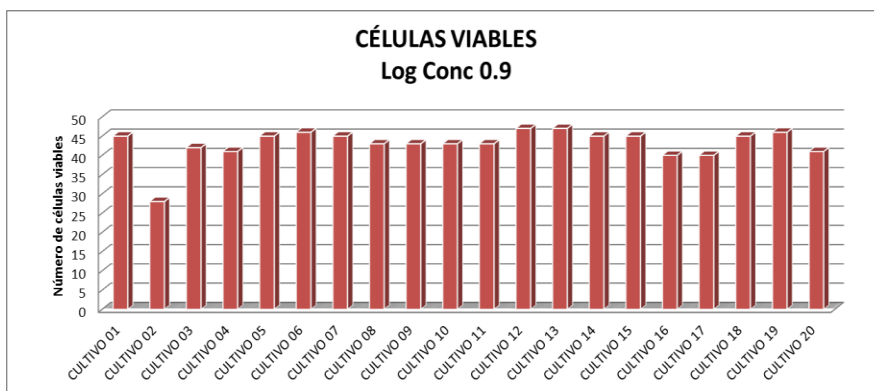


Grafico 2. Células viables Log Con 0.9

Tabla 6. Células viables Log Con 0.9

Este logaritmo de 0.9 se refiere a la concentración de 7.5 μM , en la cual el promedio de células vivas son de 43, las cuales son menores a las referentes en los cultivos sometidos a la concentración de 1.5 μM , lo cual nos refiere a una respuesta proporcional, el coeficiente de variación es mayor ya que se observa que un valor mínimo de 28, el coeficiente de variación observado es de 9.6. Cabe mencionar que observando el comportamiento del cultivo numero dos referente a la concentración de 1.5 μM este se encuentra cerca de los valores del limite inferior de respuesta, con ello observamos que la respuesta es proporcional.



Log Conc	1.2
CULTIVO 01	15
CULTIVO 02	17
CULTIVO 03	19
CULTIVO 04	27
CULTIVO 05	18
CULTIVO 06	19
CULTIVO 07	24
CULTIVO 08	17
CULTIVO 09	16
CULTIVO 10	16
CULTIVO 11	13
CULTIVO 12	16
CULTIVO 13	19
CULTIVO 14	15
CULTIVO 15	16
CULTIVO 16	14
CULTIVO 17	23
CULTIVO 18	16
CULTIVO 19	17
CULTIVO 20	22
PROMEDIO	18.0
D.E	3.6
C.V.	19.9
MÁXIMO	27
MINIMO	13

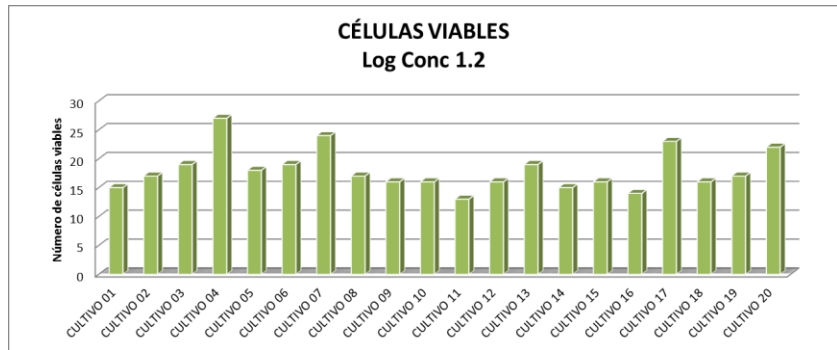


Grafico 3. Células viables Log Con 1.2

Tabla 7. Células viables Log Con 1.2

Esta concentración se refiere a 15 μ M, el coeficiente de variación aumenta ya que la respuesta obtenida va decreciendo, es decir se obtiene menor numero de células vivas, recordando que estadísticamente cantidades menores aumentan la dispersión de los datos y con ello el coeficiente de variación aumenta. Se encuentran valores de 13 como mínimo, el cual hace referencia al cultivo numero 11, lo cual no continua con la tendencia de la baja respuesta del cultivo numero dos, lo cual nos sugiere que se encuentran cambios en las células que afectan significativamente el medio en el que se encuentran para generar respuestas atípicas. Los cultivos que se encontraban en valores cerca de la media en la concentración de 7.5 μ M ya tienen variación en respuesta de acuerdo a la dosis.



Log Conc	1.6
CULTIVO 01	7
CULTIVO 02	9
CULTIVO 03	10
CULTIVO 04	19
CULTIVO 05	7
CULTIVO 06	13
CULTIVO 07	11
CULTIVO 08	11
CULTIVO 09	9
CULTIVO 10	13
CULTIVO 11	6
CULTIVO 12	7
CULTIVO 13	8
CULTIVO 14	11
CULTIVO 15	7
CULTIVO 16	7
CULTIVO 17	8
CULTIVO 18	11
CULTIVO 19	5
CULTIVO 20	7
PROMEDIO	9.3
D.E	3.2
C.V.	34.7
MÁXIMO	19
MÍNIMO	5

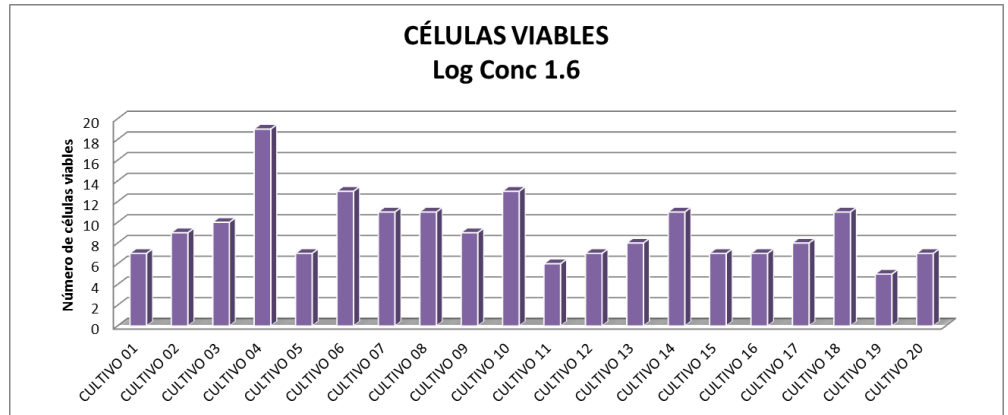


Grafico 4. Células viables Log Con 1.6

Tabla 8. Células viables Log Con 1.6

La concentración colocada en esta serie de cultivos celulares, se refiere a 37.5 μM , como antes se mencionaba al disminuir la cantidad de células vivas, se observa un aumento en la dispersión de datos, por ello se observa un coeficiente de variación de 34.7. Analizando el comportamiento de los cultivos celulares contra el logaritmo de la concentración, se observa un comportamiento aleatorio, el cual no tiene una tendencia, por ello se procede a obtener el porcentaje de células.

Los resultados de las células vivas muestran comportamientos no predictivos en los cultivos numero 19, el cual presenta el mínimo valor de células vivas, con un valor de 5. Lo cual nos indica que al aumentar la concentración del pro fármaco aumenta el numero de células muertas.



Log Conc	1.9
CULTIVO 01	4
CULTIVO 02	4
CULTIVO 03	6
CULTIVO 04	5
CULTIVO 05	4
CULTIVO 06	6
CULTIVO 07	4
CULTIVO 08	5
CULTIVO 09	7
CULTIVO 10	6
CULTIVO 11	3
CULTIVO 12	5
CULTIVO 13	7
CULTIVO 14	9
CULTIVO 15	4
CULTIVO 16	4
CULTIVO 17	5
CULTIVO 18	6
CULTIVO 19	3
CULTIVO 20	3
PROMEDIO	5.0
D.E	1.6
C.V.	31.1
MÁXIMO	9
MINIMO	3

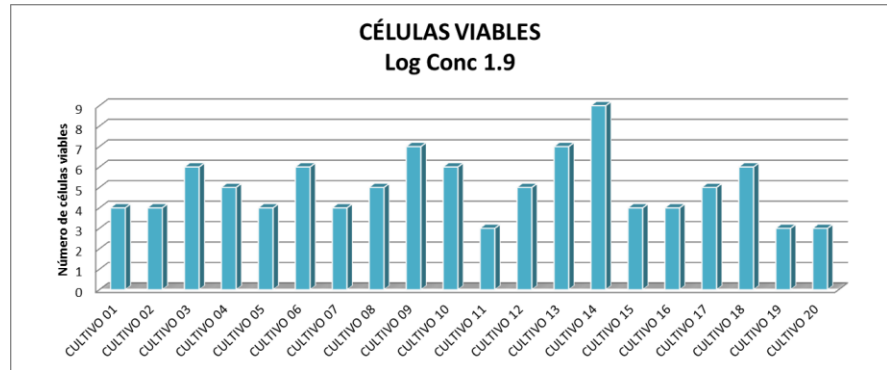


Grafico 5. Células viables Log Con 1.9

Tabla 9. Células viables Log Con 1.9

En esta serie de cultivos celulares se colocó la dosis de 75 µM, se observa que la respuesta a las células viables es menor, lo cual nos indica que el grado de toxicidad para la célula aumenta, siendo crítica para la célula, el coeficiente de variación aumenta hasta un valor de 31.1, el mínimo de respuesta obtenido es de 3, se observa que cultivo como el número 14, tolera la concentración del compuesto de prueba, ya que solo bajo dos células el número de viables, lo cual demuestra la variabilidad entre individuos, es decir con sus linfocitos y su respuesta, ya que en especial este cultivo número 14 ha presentado valores superiores a la media en las demás concentraciones, lo cual nos indica la tolerancia de los linfocitos de este sujeto de prueba.



Log Conc	2.2
CULTIVO 01	1
CULTIVO 02	3
CULTIVO 03	1
CULTIVO 04	3
CULTIVO 05	3
CULTIVO 06	3
CULTIVO 07	3
CULTIVO 08	2
CULTIVO 09	3
CULTIVO 10	2
CULTIVO 11	1
CULTIVO 12	2
CULTIVO 13	3
CULTIVO 14	2
CULTIVO 15	2
CULTIVO 16	3
CULTIVO 17	2
CULTIVO 18	3
CULTIVO 19	2
CULTIVO 20	2
PROMEDIO	2.3
D.E	0.7
C.V.	31.9
MÁXIMO	3
MINIMO	1

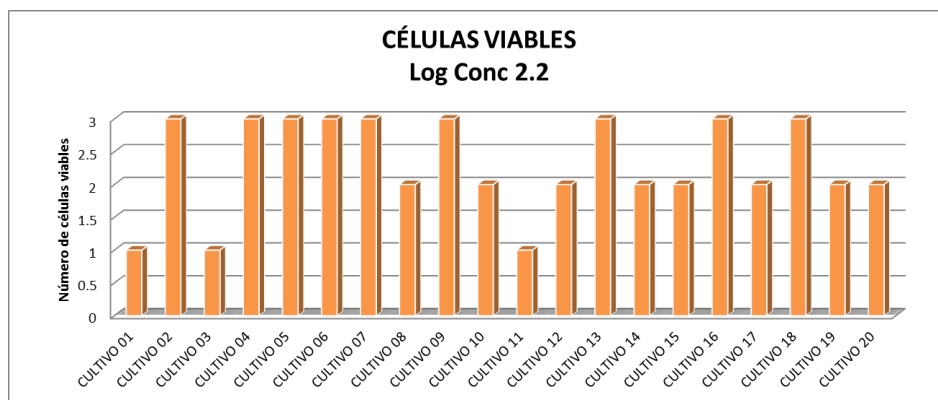


Grafico 6. Células viables Log Con 2.2

Tabla 10. Células viables Log Con 2.2

Esta concentración evaluada hace referencia a 150 μ M, se observa que el índice de células viables disminuye ya que la concentración del compuesto aumenta, determinando una toxicidad en la cual la célula ya no puede responder, de manera cuantitativa se observan valores máximos de 3 y valores mínimos de 1, así como un coeficiente de variación de 31.9. El valor de la media está por debajo del esperado, de acuerdo a la proporcionalidad de las concentraciones.

7.3.2 Células no viables



Log Conc	0.2
CULTIVO 01	2
CULTIVO 02	4
CULTIVO 03	2
CULTIVO 04	1
CULTIVO 05	2
CULTIVO 06	2
CULTIVO 07	3
CULTIVO 08	5
CULTIVO 09	2
CULTIVO 10	3
CULTIVO 11	1
CULTIVO 12	2
CULTIVO 13	5
CULTIVO 14	2
CULTIVO 15	3
CULTIVO 16	2
CULTIVO 17	3
CULTIVO 18	2
CULTIVO 19	3
CULTIVO 20	2
PROMEDIO	2.6
D.E	1.1
C.V.	43.1
MÁXIMO	5
MINIMO	1

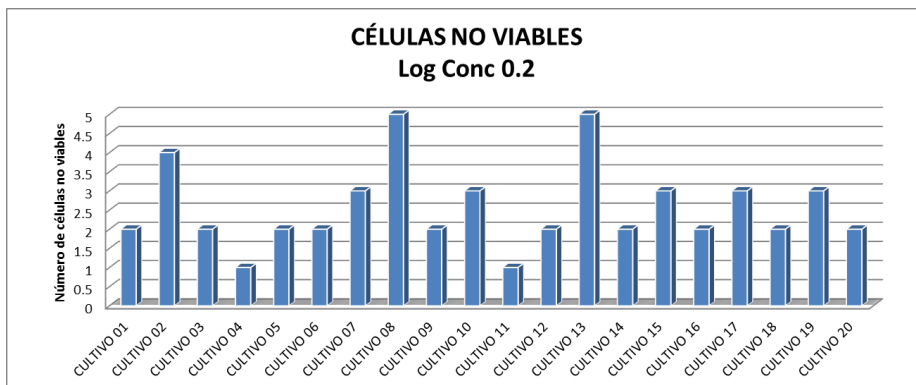


Grafico 7. Células no viables Log Con 0.2

Tabla 11. Células no viables Log Con 0.2

Esta concentración muestra el índice de células no viables con menor proporción, esto se debe ya que la concentración no es lo suficientemente fuerte para obtener una respuesta mayor, lo cual se observa de manera trazable con la grafica y tabla correspondiente a células viables, estadísticamente los resultados son dispersos.

El mínimo de respuesta de células es de 1, lo cual corresponde a la concentración de 150 µM de manera reciproca, observando la comparación entre los dos extremos de las concentraciones del compuesto.



Log Conc	0.9
CULTIVO 01	4
CULTIVO 02	6
CULTIVO 03	6
CULTIVO 04	9
CULTIVO 05	5
CULTIVO 06	6
CULTIVO 07	5
CULTIVO 08	6
CULTIVO 09	2
CULTIVO 10	6
CULTIVO 11	2
CULTIVO 12	4
CULTIVO 13	7
CULTIVO 14	4
CULTIVO 15	7
CULTIVO 16	5
CULTIVO 17	7
CULTIVO 18	5
CULTIVO 19	5
CULTIVO 20	4
PROMEDIO	5.3
D.E	1.7
C.V.	32.0
MÁXIMO	9
MINIMO	2

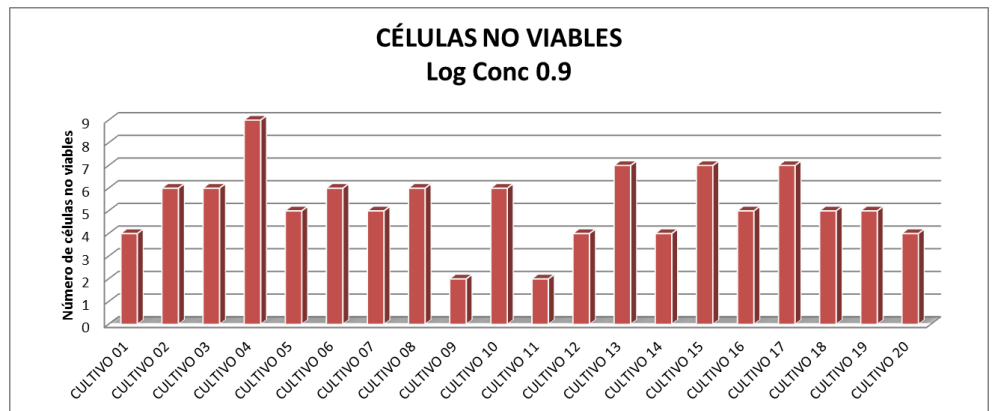


Grafico 8. Células no viables Log Con 0.9

Tabla 12. Células no viables Log Con 0.9

El cultivo numero 9 y 11 presentan respuesta con el menor numero de células muestras, mostrando también la variación entre individuos, ya que el cultivo numero 11, son de los que mostraron poca tendencia ante células viables. El coeficiente de variación es alto debido a la respuesta obtenida.



Log Conc	1.2
CULTIVO 01	8
CULTIVO 02	7
CULTIVO 03	9
CULTIVO 04	13
CULTIVO 05	9
CULTIVO 06	13
CULTIVO 07	9
CULTIVO 08	14
CULTIVO 09	9
CULTIVO 10	10
CULTIVO 11	4
CULTIVO 12	8
CULTIVO 13	9
CULTIVO 14	11
CULTIVO 15	11
CULTIVO 16	7
CULTIVO 17	28
CULTIVO 18	10
CULTIVO 19	10
CULTIVO 20	9
PROMEDIO	10.4
D.E	4.7
C.V.	45.5
MÁXIMO	28
MINIMO	4

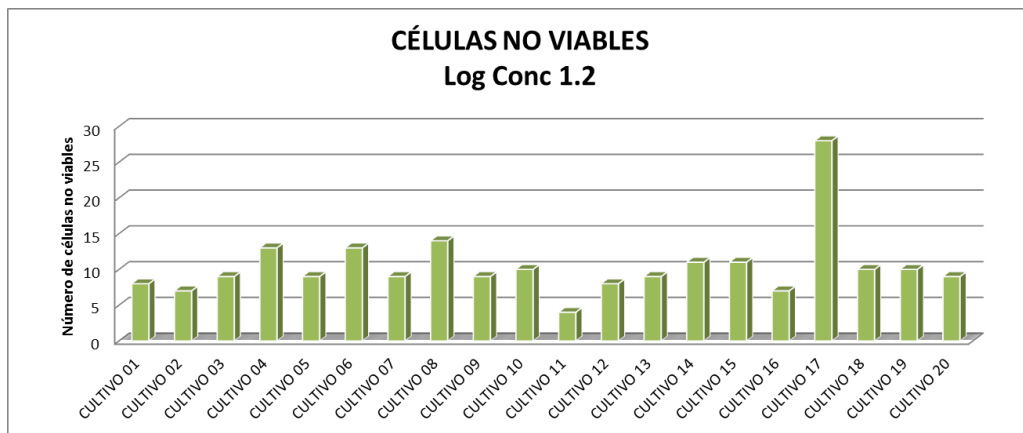


Grafico 9. Células no viables Log Con 1.2

Tabla 13. Células no viables Log Con 1.2

En esta concentración de 15 µM se observa una respuesta proporcional a la concentración anterior, esta concentración muestra un valor mínimo de 4, observado en el cultivo celular numero 11, evidenciando la resistencia de las células al compuesto que genera toxicidad.



Log Conc	1.6
CULTIVO 01	24
CULTIVO 02	26
CULTIVO 03	22
CULTIVO 04	26
CULTIVO 05	21
CULTIVO 06	28
CULTIVO 07	24
CULTIVO 08	27
CULTIVO 09	41
CULTIVO 10	28
CULTIVO 11	21
CULTIVO 12	25
CULTIVO 13	23
CULTIVO 14	28
CULTIVO 15	26
CULTIVO 16	18
CULTIVO 17	36
CULTIVO 18	22
CULTIVO 19	30
CULTIVO 20	31
PROMEDIO	26.4
D.E	5.3
C.V.	20.2
MÁXIMO	41
MINIMO	18

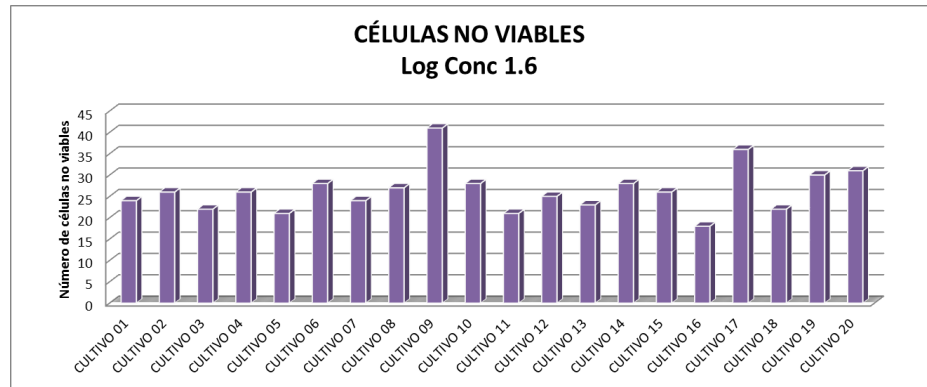


Grafico 10. Células no viables Log Con 1.6

Tabla 14. Células no viables Log Con 1.6

Las células no viables aumentan debido a una concentración mayor, lo cual genera mayor toxicidad en las células, a pesar de tener mayor cantidad de células el coeficiente de variación es de 20.2, el cultivo numero 9 muestra la mayor cantidad de células no viables, lo cual se observa en esta concentración ya que en concentraciones menores, se encuentre cerca de la media o por debajo de la media.



Log Conc	1.9
CULTIVO 01	38
CULTIVO 02	41
CULTIVO 03	38
CULTIVO 04	41
CULTIVO 05	40
CULTIVO 06	41
CULTIVO 07	36
CULTIVO 08	42
CULTIVO 09	72
CULTIVO 10	43
CULTIVO 11	35
CULTIVO 12	39
CULTIVO 13	38
CULTIVO 14	39
CULTIVO 15	44
CULTIVO 16	35
CULTIVO 17	43
CULTIVO 18	35
CULTIVO 19	32
CULTIVO 20	41
PROMEDIO	40.7
D.E	8.0
C.V.	19.8
MÁXIMO	72
MINIMO	32

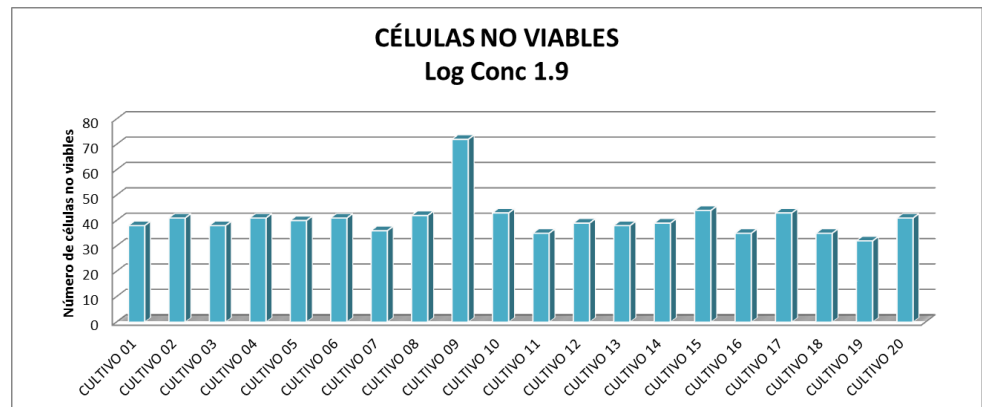


Grafico 11. Células no viables Log Con 1.9

Tabla 15. Células no viables Log Con 1.9

En esta concentración se muestra que el cultivo numero 19 tiene valores bajos de células no viables, sin embargo en concentraciones menores se encontraba en la media, el coeficiente de variación disminuye pero no satisfactoriamente mostrando mayor variabilidad en la respuesta de células no viables referente a las células viables.



Log Conc	2.2
CULTIVO 01	41
CULTIVO 02	42
CULTIVO 03	41
CULTIVO 04	45
CULTIVO 05	43
CULTIVO 06	48
CULTIVO 07	44
CULTIVO 08	48
CULTIVO 09	83
CULTIVO 10	46
CULTIVO 11	49
CULTIVO 12	43
CULTIVO 13	44
CULTIVO 14	46
CULTIVO 15	50
CULTIVO 16	44
CULTIVO 17	48
CULTIVO 18	41
CULTIVO 19	46
CULTIVO 20	45
PROMEDIO	46.9
D.E	8.9
C.V.	19.1
MÁXIMO	83
MINIMO	41

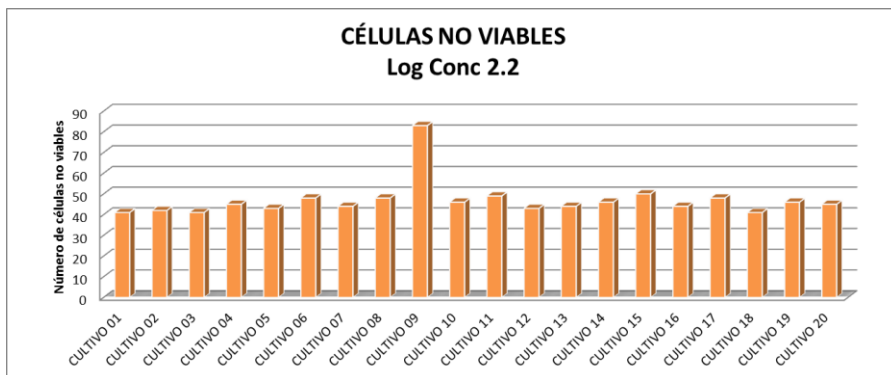


Grafico 12. Células no viables Log Con 2.2

Tabla 16. Células no viables Log Con 2.2

Se observan que los cultivos 9 así como el 11 tiene respuestas variables conforme se coloca la cantidad de pro fármaco, el coeficiente no logro bajar de un valor de 19, el cultivo con mayor comportamiento atípico se encuentra en esos rangos.



7.4 ANÁLISIS PROBIT

Para realizar el análisis probit, se colocan los datos estadísticos obtenidos en una tabla, en el cual se concentra la dosis, al cual se obtiene el Logaritmo, así como la suma de las células vivas y muertas en total de los cultivos celulares. Para la determinación de la concentración Inhibitoria 50, se consideran los valores de los cultivos control, es decir sin dosis del compuesto compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2- propanolol, se considera ya que factores como condiciones del medio de cultivo, pueden propiciar la muerte celular, por ello se consideró esta variante.

El análisis Probit, se realizara simultáneamente con el análisis Logit, con el propósito de comparar los resultados analizados.

Conc. (μM)	Log Conc	Células viables	Células no viables
150.0	2.2	46	937
75.0	1.9	100	813
37.5	1.6	186	527
15.0	1.2	359	208
7.5	0.9	860	105
1.5	0.2	945	51
0.0	No Aplica	952	26

Tabla 18. Datos obtenidos experimentalmente

Al tener valores logarítmicos se obtendrá una curva sigmoidea.

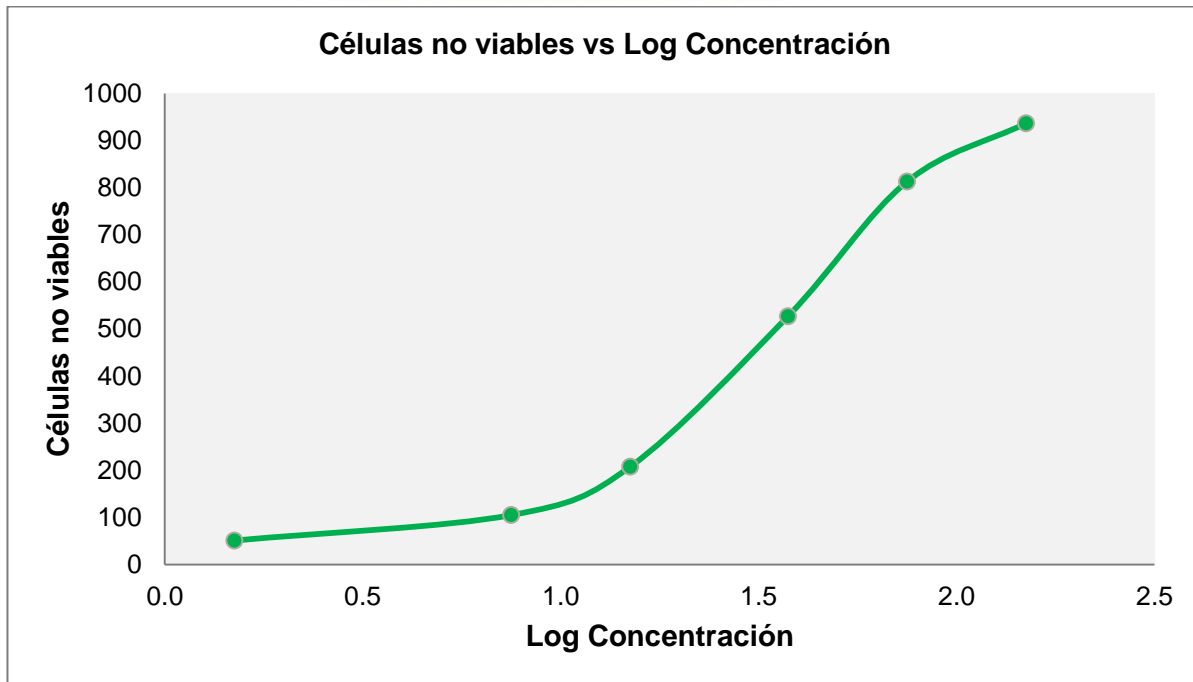


Gráfico 14. Curva sigmoidea de los datos obtenidos experimentalmente.

Se obtiene la proporción en relación a las células, mediante la siguiente formula:

$$\text{Proporción de células} = \frac{\text{Células no viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}}$$

Conc. (µM)	Log Conc	Células viables	Células no viables	Prop, P
150.0	2.2	46	937	0.9532
75.0	1.9	100	813	0.8905
37.5	1.6	186	527	0.7391
15.0	1.2	359	208	0.3668
7.5	0.9	860	105	0.1088
1.5	0.2	945	51	0.0512
0.0	No Aplica	952	26	0.0266

Tabla 19. Proporción P.



Se observan valores obtenidos de la proporción desde cero hasta uno, los cuales corresponden a las concentraciones menores, es decir de 1.5 µM, con proporción proxima a cero y el valor de 150 µM con proporción proxima a uno.

A continuación se obtiene la Corrección a la proporción obtenida, por ello el cálculo se considera a partir de este valor en concentraciones mayores, ya que en concentraciones menores se obtendrán valores negativos, ya que la respuesta es baja en células muertas.

Posteriormente se realiza la corrección de la Proporción P, en este cálculo se considera los cultivos control, para descartar la respuesta natural, sobre el efecto del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2- propanolol evaluado. Lo antes mencionado se realiza por medio de la siguiente formula:

$$\text{Corrección Prop, P} = \frac{\text{Prop, P concentración evaluada} - \text{Prop, P concentración cero}}{1 - \text{Prop, P concentración cero}}$$

Conc. (µM)	Log Conc	Células viables	Células no viables	Prop, P	Corr, P
150.0	2.2	46	937	0.9532	0.9519
75.0	1.9	100	813	0.8905	0.8875
37.5	1.6	186	527	0.7391	0.7320
15.0	1.2	359	208	0.3668	0.3496
7.5	0.9	860	105	0.1088	0.0845
1.5	0.2	945	51	0.0512	0.0253
0.0	No Aplica	952	26	0.0266	0.0000

Tabla 20. Corrección P.

Los resultados obtenidos corresponden al valor real de las células afectadas por la citotoxicidad del 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2- propanolol.

A continuación se obtiene el análisis Logit (P), la cual toma como base la proporción del punto medio, en este caso consideramos la concentración 15 µM, ya que tiene un total de células



viabiles de 359, el número de células no viabiles es de 208, el cual es valor próximo de 179.5 el cual corresponde al 50 por cierto de células vivas.

Se obtiene con la siguiente formula:

$$Logit (P) = \frac{LN (Corr, P)}{1 - Prop, P}$$

Donde LN se refiere al logaritmo natural.

Conc. (µM)	Log Conc	Células viabiles	Células no viabiles	Prop, P	Corr, P	Logit (P)
150.0	2.2	46	937	0.9532	0.9519	3.0127
75.0	1.9	100	813	0.8905	0.8875	2.0922
37.5	1.6	186	527	0.7391	0.7320	1.0318
15.0	1.2	359	208	0.3668	0.3496	-0.5941
7.5	0.9	860	105	0.1088	0.0845	
1.5	0.2	945	51	0.0512	0.0253	
0.0	No Aplica	952	26	0.0266	0.0000	

Tabla 21. Logit (P).

Se descarta el valor de la concentración mayor, de 150 µM ya que muestra valores de citotoxicidad celular mayor al 50 por ciento, de acuerdo a los valores obtenidos por Logit (P), se obtiene el valor de los siguientes elementos, referentes a la concentración evaluada, sin considerar los valores referentes a la concentración 150 µM:

- Pendiente
- Intercepto (Intersección al eje)

Log Conc	Logit (P)
1.9	2.0922
1.6	1.0318
1.2	-0.5941

Tabla 22. Datos para obtener la pendiente y le intercepto.



PENDIENTE	3.8559
INTERCEPTO	-5.1014

Tabla 23. Datos obtenidos de pendiente e intercepto.

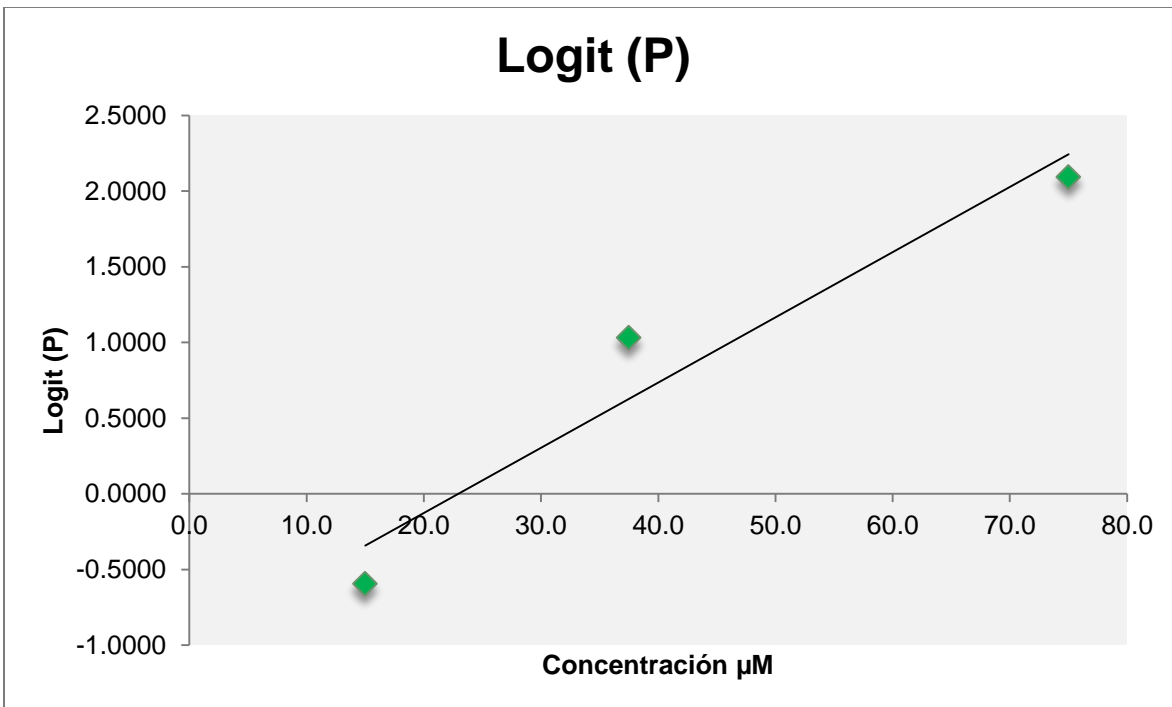


Gráfico 15. Logit (P) vs Concentración en µM.

Se grafica la información obtenida con el análisis Logit (P) para verificar que pase sobre el eje X, ya que se le asigna como Valor de Prueba cero, en este caso cumple con esa condición por ello el análisis estadístico es válido y se procede a determinar el Logaritmo de la Concentración, por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Log (Conc)} = \frac{\text{Valor de prueba} - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}}$$



Obteniendo el siguiente resultado:

Log (Conc)	1.3230
------------	--------

Tabla 24. Datos obtenidos del Log (Conc).

Finalmente se procede a calcular la Concentración Inhibitoria 50, por medio de Logit (P), con la siguiente formula:

$$\text{Concentración Inhibitoria } 50 = 10^{\text{Log (Conc)}}$$

Se obtuvo un valor de Concentración Inhibitoria 50 de 21.0388 µM.

Consecuentemente se procede a ejecutar los cálculos necesarios para el análisis probit, el cual parte de los valores de la Proporción de células y de la Corrección, tal como se muestra en la siguiente tabla, las cuales determinan por las formulas en listadas.

$$\text{Porporción de células} = \frac{\text{Células no viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}}$$

$$\text{Corrección Prop, P} = \frac{\text{Prop, P concentración evaluada} - \text{Prop, P concentración cero}}{1 - \text{Prop, P concentración cero}}$$

Conc. (µM)	Log Conc	Células viables	Células no viables	Prop, P	Corr, P
150.0	2.2	46	937	0.9532	0.9519
75.0	1.9	100	813	0.8905	0.8875
37.5	1.6	186	527	0.7391	0.7320
15.0	1.2	359	208	0.3668	0.3496
7.5	0.9	860	105	0.1088	0.0845
1.5	0.2	945	51	0.0512	0.0253
0.0	No Aplica	952	26	0.0266	0.0000

Tabla 20. Corrección P.



A continuación se obtiene el análisis Probit (P), la cual toma como base la proporción del punto medio, en este caso consideramos la concentración 15 µM, ya que tiene un total de células viables de 359, el número de células no viables es de 208, el cual es valor próximo de 179.5 el cual corresponde al 50 por ciento de células vivas.

Se obtiene el valor de Probit P, considerando como 5 un valor estándar para el cálculo en análisis Probit, al cual se adiciona la inverso de la distribución normal estándar acumulativa, ya que como se observa en la gráfica de Log Concentración versus el número de células muertas presenta un comportamiento sigmoideo o una Proción de la campana de Gauss, demostrando una distribución normal. El inverso de la distribución normal estándar acumulativa tiene como obligatorio una probabilidad correspondiente a la distribución normal, el cual dependerá si el valor es igual o mayor a cero.

En este caso nuestra probabilidad es la Corrección P, la cual es el valor real de la respuesta a la citotoxicidad del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1,2,3-triazolil) -2- propanolol.

Fórmula para análisis Probit P:

$$Probit P = 5 + INV.NORM.ESTAND (Corr, P)$$

Se obtienen los siguientes resultados:

Conc. (µM)	Log Conc	Células viables	Células no viables	Prop, P	Corr, P	Probit P
150.0	2.2	46	937	0.9532	0.9519	6.6638
75.0	1.9	100	813	0.8905	0.8875	6.2132
37.5	1.6	186	527	0.7391	0.7320	5.6189
15.0	1.2	359	208	0.3668	0.3496	4.6135
7.5	0.9	860	105	0.1088	0.0845	
1.5	0.2	945	51	0.0512	0.0253	
0.0	No Aplica	952	26	0.0266	0.0000	

Tabla 25. Obtención de análisis Probit P.



Se descarta el valor de la concentración mayor, de 150 μM ya que muestra valores de citotoxicidad celular mayor al 50 por ciento, de acuerdo a los valores obtenidos por Probit (P), se obtiene el valor de los siguientes elementos, referentes a la concentración evaluada, sin considerar los valores referentes a la concentración 150 μM :

- Pendiente
- Intercepto (Intersección al eje)

Log Conc	Probit P
1.9	6.2132
1.6	5.6189
1.2	4.6135

Tabla 26. Datos para obtener valores de pendiente e intercepto.

PENDIENTE	2.3012
INTERCEPTO	1.9341

Tabla 27. Valores obtenidos para pendiente e intercepto.

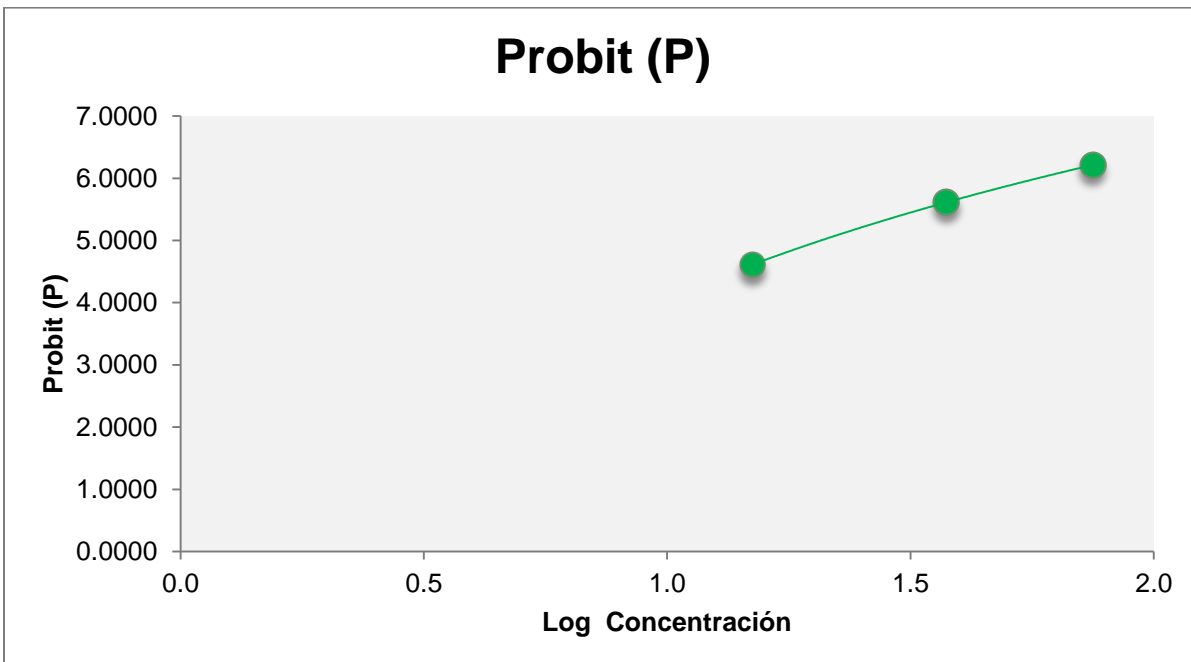


Gráfico 16. Probit (P) vs el Logaritmo de la Concentración.



Se grafica la información obtenida con el análisis Probit (P) para verificar que la intersección considerando el valor Probit (P) de cinco, por lo cual se observa un valor de aproximadamente de Log Concentración de 1.31, el cual nos indica que se encuentra en un valor dentro del rango de 15.0 μM y 37.5 μM , restando ambos valores obtenemos una concentración de 22.5 μM , este cálculo es aproximado más no exacto por lo cual solo es útil como comprobación del cálculo que a continuación se realizara para la Concentración Inhibitoria 50.

Conc. (μM)	Log Conc
37.5	1.6
15.0	1.2

Tabla 28. Datos próximos de la Concentración Inhibitoria 50.

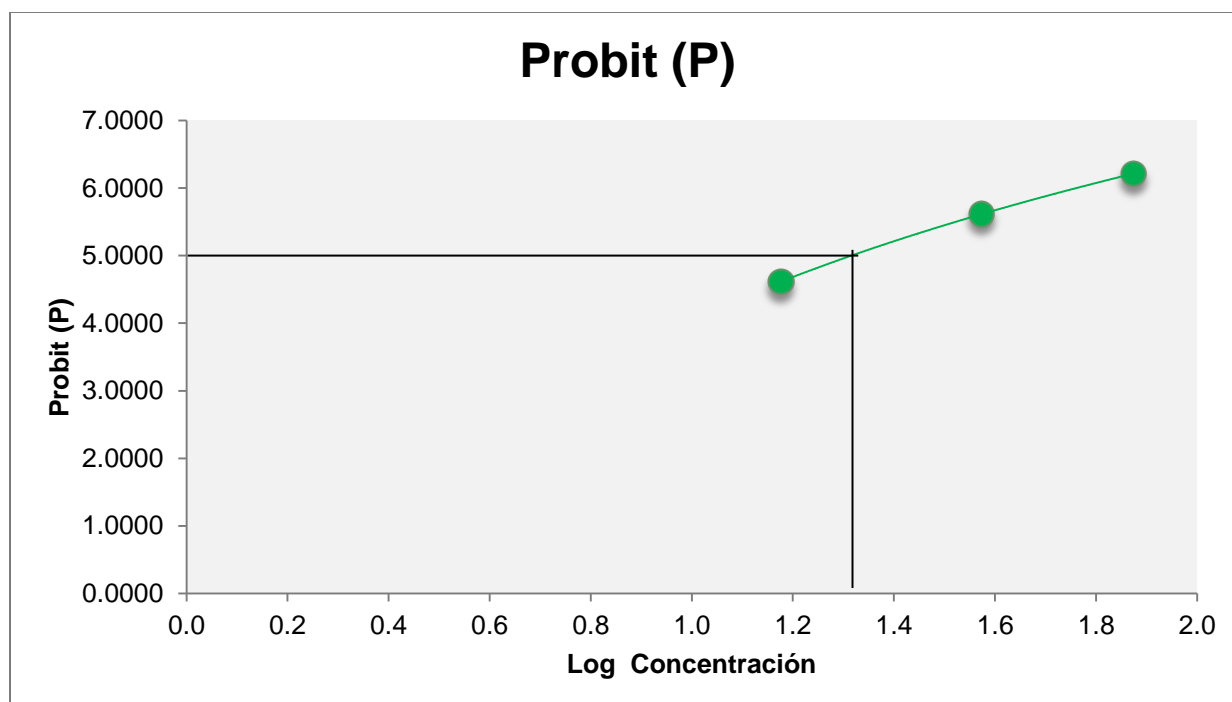


Gráfico 17. Probit (P) vs el Logaritmo de la Concentración con intercepto en valor 5 de Probit (P).



Se procede a determinar el Logaritmo de la Concentración, por medio de la siguiente formula:

$$\text{Log (Conc)} = \frac{\text{Valor de prueba} - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

Obteniendo el siguiente resultado:

Log (Conc)	1.3323
------------	--------

Tabla 29. Log (Conc).

Finalmente se procede a calcular la Concentración Inhibitoria 50, por medio de Logit (P), con la siguiente formula:

$$\text{Concentración Inhibitoria 50} = 10^{\text{Log (Conc)}}$$

Se obtuvo un valor de Concentración Inhibitoria 50 de 21.4946 μM .

Determinando el valor de la Concentración Inhibitoria 50 considerando el porcentaje de las células se obtienen resultados para Logit (P) de 21.3878 μM y por análisis Probit (P) de 21.8534 μM . Comprobando los resultados obtenidos, sin embargo los resultados validos son los evaluados con el número de células contadas, ya que no interfiere el cálculo a porcentaje en los decimales, obteniendo un resultado preciso, aunque ambos valores están en valores de variación permisibles.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS



8. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.

En este ensayo se establece la Concentración Inhibitoria 50 de 21.5 μM , la variación inter-individuo genera diferentes respuestas al compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, lo cual ayuda a establecer concentraciones de prueba en ensayos con “*in vivo*”.

La determinación de la Concentración Inhibitoria 50 se realizó por medio de la exposición de células de sujetos de estudio evaluados por criterios de aceptación ante mencionados, se ejecutaron cultivo celular de linfocitos, en los cuales se colocó concentraciones de 150 μM , 75 μM , 37.5 μM , 15 μM , 7.5 μM y 1.5 μM .

Se observan resultados en el conteo celular con coeficientes de variación altos, debido a la variación en la respuesta inter-individuo, por la matriz biológica que se maneja, además la relación entre un método biológico es mayor al 5% de acuerdo a lo indicado en guías ICH, FDA, Guía de Validación de Métodos Analíticos, se observaron sujetos de estudio con sobre peso y un caso con obesidad tipo I, lo cual es alarmante ya que este factor influye en la respuesta inmunológica, ya que el cuerpo presenta estadios de inflamación y con ello propicia las anomalías en el crecimiento celular. Por ello en este estudio se establece la relación de expresión génica de NF-KB, como indicador de probabilidad al desarrollo de cáncer de mama, es decir puede fungir como blanco terapéutico del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, ya que la familia de los azoles han mostrado efecto antiinflamatorio.

Es importante mencionar que la respuesta obtenida en los cultivos celulares ante esta toxicidad celular en una sola dosis, la cual se clasifica como aguda, ya que la respuesta obtenida fue en 24 horas, es relacionada con las características físico-químicas del compuesto 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2-propanolol, ya que al presentar características de una BCS Clase II con baja solubilidad y alta permeabilidad, al proporcionar el cambio de polaridades en la solución en la cual está el compuesto, permite la permeabilidad en la célula, así obteniendo la respuesta ante la toxicidad, por ello se debe verificar los adyuvantes que se usaran para seguir el estudio de la molécula, considerándolo como API o como Producto terminado, con excipientes orientados a mejorar la solubilidad.



El método estadístico utilizado se determinó por medio de referencias bibliográficas como la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y la Farmacopea de los Estados Unidos, ya que contemplan el análisis Probit para determinar la Concentración Inhibitoria 50.

Los datos tratados se realizó de acuerdo a la Oxford University Press, el cual tienen el fundamento indicado por las Farmacopeas Mexicanas y Americanas. Se realizó la verificación de los datos obtenidos por medio del método estadístico Logit versus Probit encontrado una diferencia de 0.5, además de métodos gráficos los cuales no son exactos pero son indicativos.

Cabe mencionar que el tratamiento de datos es importante ya que el obtener el porcentaje de células afecta mínimo los valores obtenidos, dando una diferencia de los datos por células de 0.4, lo cual es permisible.

Por lo antes mencionado el valor de la Concentración Inhibitoria 50 es válido, por ello se muestra la robustez y tolerancia del método estadístico Probit.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



CAPÍTULO IX

REFERENCIAS DE CONSULTA



9. REFERENCIAS DE CONSULTA

1. American Cancer Society. (2014). Guide Breast Cancer. Revisado Marzo 2014 [Citado 2014 Marzo 15]; Disponible <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>.
2. Globocan (2012), IARC. [Citado 2014 Marzo 15].
3. (World Health Organization. Cancer. Hoja Informativa 2014 Revisado Marzo 2014 [Citado 2014 Marzo 15]; Disponible <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>).
4. Curado M.P. (2011). Breast cancer in the world: Incidence and mortality Salud Publica Mex; 53: 372-384.
5. World Health Organization. Cancer de mama. Datos disponibles de cáncer. Revisado Marzo 2014 [Citado 2014 Marzo 15]; Disponible <http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>.
6. Secretaria de Salud. (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Pp 1 – 10.
7. Weigelt B. Reis J. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?. Nature Reviews Clinical Oncology 6. Pp. 718-730.
8. Reis J, Pusztai L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification prognostication, and prediction. Lancet Vol 378. Pp.1812 - 1823.
9. Cárdenas J, Erazo A. (2010). Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. Elsevier. Gaceta Mexicana de Oncología. GAMO Vol. 10 Supl. 5. Pp. 3 – 5.
10. Alizart M, et al. (2012). Molecular classification of breast carcinoma. Elsevier. Diagnostic histopathology 18:3. Mini-symposium: the biological phenotype of breast cancer. Pp. 1 – 5.
11. Eroles P. et al. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. Elsevier. Cancer Treatment Reviews 38. Pp. 698–707.
12. Edlich RF, Winters KL, Lin KY. (2005). Breast cancer and ovarian cancer genetics. J Long Term Eff Med Implants. 15(5). Pp. 533-45.
13. Prat A, Ellis M, Perou C. (2012). Practical implications of gene expression based assays for breast oncologists. Nature Reviews Clinical Oncology 9. Pp. 48-57.
14. Hidalgo M. Jiménez G. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. Salud Publica Mex 2009;51 supl 2. Pp. 197 - 207.



15. Baltimore D. (2011). NF- κ B is 25. NF- κ B-mediated inflammatory biology can be formulated as the following five states: latency, induction, response, resolution and pathology. The first four involve carefully tuned molecular processes; pathology is the loss of control. *Nature Immunology* volume 12 number 8. Pp. 683 – 685.
16. Khalil N. (2011). Synthesis of Novel 1, ω -Bis[4-[(arylcaramothioylamino) carbamoyl]phenoxy]-alkanes and 1, ω -bis[4-(4-aryl-5-thioxo-1H-1,2,4-triazol-3-yl) phenoxy]alkanes with Potential Antimicrobial Activity. *International Journal of Applied Chemistry*. ISSN 0973-1792 Volume 7 Number 2. Pp. 183-201.
17. Pitucha M, Rzymowska J, Olender A, Grzybowska-Szatkowska L. (2012). Synthesis of 1,6-hexanediy-bis (semicarbazides) and 1,6-hexanediy-bis(1,2,4-triazol-5-ones) and their antiproliferative and antimicrobial activity. *Journal of Serbian Chemical Society* – 4243. Pp 04-07.
18. Augustin E. et. al, (2013). CYP3A4 overexpression enhances the cytotoxicity of the antitumor triazoloacridinone derivative C-1305 in CHO cells. *Nature. Acta Pharmacologica Sinica* 34. Pp.146–156.
19. Webber G. (2012). Drug Development Drug Interaction Potential Using In Vitro Methods — Part II. *Pharma magazine*. Pp. 1 – 3.
20. Avanzo R. et. Al. (2011). 1,2,4-Triazole D-ribose derivatives: Design, synthesis and antitumoral evaluation. Elsevier. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Pp. 104-110.
21. Ling J, Kumar R. (2012). Crosstalk between NF κ B and glucocorticoid signaling: A potential target of breast cancer therapy. *Cancer Letters* 322. Pp.119–126.
22. Xia Yia. et. al. (2011). Targeting heat shock factor 1 with a triazole nucleoside analog to elicit potent anticancer activity on drug-resistant pancreatic cancer. Elsevier. *Cancer Letters* 318 Pp.145–153.
23. Feng Li, Gautam Sethi. (2010). Targeting transcription factor NF- κ B to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. Elsevier. *Biochimica Biophysica Acta* 1805 Pp. 167–180.
24. Ruland J. (2011). Return to homeostasis: down regulation of NF- κ B responses. *Nature immunology*. Volume 12 Number 8.
25. Kamal A. (2011). Synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl isoxazoline/isoxazolelinked 2,3-dihydroquinazolinone hybrids as anticanceragents. *European Journal of Medical Chemistry*. Volume 46. Issue 2. Pp. 691 – 70.



26. Gupta S, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal B. (2010). Inhibiting NF- κ B Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy. *Biochim Biophys Acta.* ; 1799(10-12): 775–787.
27. Abid B., Shameem A., Bashir A. (2012). Antimicrobial studies of unsymmetrical bis-1,2,3-triazoles. *Organic and Medical Chemistry Letters*. Springer. Pp. 1.
28. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Undecima edición. 2014. Pp. 2700-2710.
29. Applied Biosystems. Guide for Real Time PCR. Part Number 4371089 Revision A. 117GU15-01.
30. USP Oficial. 2014.General Chapters. 1032. Design and development of biological assays. Pp. 6,7.
31. USP Oficial. 2014.General Chapters. 1034. Analysis of Biological assays. Pp. 1,26.
32. Manna S, Manna P, Sarkar A. (2007). Inhibition of RelA phosphorylation sensitizes apoptosis in constitutive NF-kappaB-expressing and chemo resistant cells. *Nature Cell Death and Differentiation* 14, 158–170.
33. Aggarwal B, Vijayalekshmi R, Sung B. (2009). Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clin Cancer Res*;15:425-430.
34. Caldwell GW, Yan Z, W Lang, Masucci JA. (2012). The IC(50) concept revisited. *Curr Top Med Chem*; 12(11): 1282-90.
35. Clothier R. et al. (2013) Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the Acute Tox Project. Elsevier. *Toxicology in Vitro* 27 1347–1356.
36. Grosh S, et al. (2001). COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *The FASEB Journal*. Vol. 15.
37. Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities) Questions and answer Guidance for Industry.
38. Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012. Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano.
39. Guía de Validación de Métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. Edición 2002. CNQFB.
40. Strategic plan for regulatory science and research. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) FDA.
41. A practical guide to immunoassay method validation. Andreasson U. et al. 2015.



42. Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). United States Department of Health and Human Services. United States Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (US). Center for Drug Evaluation and Research (US).
43. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
44. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.
45. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambialidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centro de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de bicomparabilidad.
46. Guidance for industry, analytical procedures and methods validation chemistry, manufacturing and control documentation, draft guidance, FDA 2000.
47. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Draft Guidance. 2013.
48. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry. 2015.
49. Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices. 2011.
50. Tablas de variabilidad biológica.
51. Six sigma.
52. CCAYAC. Validación de métodos analíticos.
53. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline. 2005.
54. The fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (EURACHEM) 2014.
55. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC technical Report). Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5, pp. 835-855, 2002.
56. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.



57. Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures. ICH-Q2A. 1995.
58. OMCL Network of the Council of Europe General Document. PA/PH/OMCL (13) 82 2R. Validation of analytical procedures. 2014.
59. Guide to Quality in Analytical Chemistry an aid to Accreditation. CITAC Guide. EURACHEM. 2016
60. Validation of Compendial Procedures. The United States Pharmacopeia. <1225> 40-NF 35.
61. Verification of Compendial Procedures. The United States Pharmacopeia. <1226> 40-NF 35.
62. Pharmaceutical Quality System. Q10. Harmonised Tripartite Guideline (ICH).
63. NORMA ISO-IEC 17025 (NMX-EC-17025).
64. Guideline Bioanalytical methos validation. European Medicines Agent.
65. The EMA Bioanalytical Method validation Guideline. Japan.
66. AAPS Views on Bioanalytical Method Validation Harmonization.
67. Guía de validación de métodos bioanalíticos EMA Europea.
68. *Cultek. Protocolos y técnicas. Soluciones cultivos celulares.*
69. https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/es/SSLVMB_23.0.0/spss/regression/idh_5440.html
70. Beltrán Nohra Elsy. Departamento de Procesos y Tecnología. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS. Universidad Autónoma Metropolitana. 2016
71. Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP. Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). 2008
72. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. FDA 2017.
73. Brand. Ficha tecnica de Camaras Neubauer.



ANEXO I

ÉTICA DEL ESTUDIO

ANEXO I .- ÉTICA DEL ESTUDIO

NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.



NOM-004-SSA3-2012 Del expediente clínico.

NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.

The MIQE Guidelines.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Undécima edición. 2014.

USP 37 NF 32 .2014.

AMM. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2013.



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



ANEXO II

CARTA CONSENTIMIENTO CUESTIONARIO



ANEXO II.

1. CARTA CONSENTIMIENTO.

2. CUESTIONARIO.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

“Determinación de la CI50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2- propanolol y su relación con NF - kB como blanco terapéutico en células con cáncer de mama.”

VIGENCIA JUN 2017 – JUNIO 2018 / VERSIÓN 01

INVESTIGADOR: P.Q.F.B. María Guadalupe Jiménez Alcántara

CORREO ELECTRÓNICO DEL INVESTIGADOR: malu.jia@gmail.com

DIRECCIÓN FACULTAD DE QUÍMICA: Paseo Colón S/N, Residencial Colón, 50120 Toluca de Lerdo, Méx.

TELÉFONO DE CONTACTO DEL INVESTIGADOR: 7222673442

TELÉFONO DE CONTACTO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA: (01 722) 217 3890 y 217 5109

INVESTIGADORES PARTICIPANTES: Dr. en C. Jonnathan G. Santillán Benítez / Ph. D. Miriam Verónica Flores Merino.

Toluca, México, a _____ de _____ de 201____.

Folio _____.

Esta carta consentimiento informado cumple con lo establecido por el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, así como el Título Decimocuarto respecto a la donación, en los lineamiento de la Conferencia Internacional de Armonización Guía ICH E6 (R1) Guía para Buenas Prácticas Clínicas, Código Nuremberg, la Declaración de Helsinki, Lineamientos para cumplir las buenas prácticas clínicas en la investigación para la salud (COFEPRIS), las Guías Éticas Internacionales para Investigación Biomédica que Involucra a Seres Humanos, del Consejo de Organizaciones Internacionales de la Ciencias Médicas (por sus siglas en inglés CIOMS) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Declaración



internacional sobre los datos genéticos humanos (UNESCO), Normativa respecto a la donación en vida del CENATRA, Legislación sobre donación y trasplante de órganos, tejidos y células: compilación y análisis comparado (Organización Panamericana de la Salud). NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico - infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, NOM-004-SSA3-2012 Del expediente clínico, NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, The MIQE Guidelines, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11 edición. 2014, USP 39 NF 34. 2016, NCCN Guidelines for Patients®. Breast cancer.

Estimada Sra. _____

La Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México por medio de esta carta de consentimiento informado se le hace la atenta invitación a participar por medio de la donación de una **muestra sanguínea** de 5 mL en el Proyecto de Investigación “Determinación de la CI50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2- propanolol y su relación con NF - kB como blanco terapéutico en células con cáncer de mama” que tiene como objetivo demostrar la toxicidad de un compuesto triazol, en células sanguíneas tales como leucocitos, con lo cual se determinara la concentración a la cual es efectivo, de la misma manera se establecera la relación con NF - kB como blanco terapéutico en células con cáncer de mama. La duración de este proyecto de investigación se realizara durante el año en curso. Usted fue invitada a participar ya que cuenta con las siguientes características dentro de los criterios de aceptación.

Su participación en este estudio consiste en autorizar la carta de consentimiento informado, contestar el cuestionario de factores predisponentes, medición de peso, talla y cintura; dichos datos se identificaran con el número de folio asignado, se procederá a la donación de una muestra sanguínea de 5 mL, la muestra será identificada con su nombre y numero de folio asignado, se almacenará bajo condiciones adecuadas, posteriormente se realizara una Citometría Hemática (muestra sanguínea), se realizara el cultivo celular (de la muestra sanguínea) así como la determinación de la concentración inhibitoria 50 y se establecerá la relación con NF - kB de acuerdo a lo reportado en la bibliografía.

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala



que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial, de la misma manera puede presentarse la necesidad de realizar una segunda punción en caso de venas de difícil acceso.

El proyecto de investigación no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de la concentración inhibitoria 50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2- propanolol y su relación con NF - kB podría permitir desarrollar nuevos blancos terapéuticos y con esto hacer un tratamiento más personalizado del cáncer de mama. Además gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta enfermedad.

El investigador proporcionara los resultados de la Citometría Hemática a los donadores por medio de la institución en la cual se realizo la toma de muestra. La información respecto a la trazabilidad de la muestra donada se proporcionara en caso de ser solicitada por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, lugar en el cual se realizara la investigación presente. Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE:

Yo, _____ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria, no recibí retribución monetaria, la realizo de manera autónoma y consiente, se me ha explicado mi participación en el proyecto de investigación, el cual es sin fines de lucro, se me explico el manejo y disposición final de mi muestra donada, así como la información que proporciono.

Los datos proporcionados en esta carta consentimiento y en el cuestionario de factores predisponentes se manejaran de acuerdo a los principios y derechos con los que cuento; tales como confidencialidad, gratuidad al realizar el estudio de acuerdo a los objetivos de dicho proyecto y accesibilidad a la información generada.



Se me ha informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del proyecto de investigación, sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, informare por escrito tal decisión dirigida al responsable del Proyecto; recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el proyecto de investigación. Puedo obtener los resultados de mi Citometría Hemática si los solicito.

Mi responsabilidad como participante incluyen: reportar cambios de dirección, teléfono, estado de salud o cualquier otra acción que modifique los resultados del estudio. Así como recoger los resultados de la Citometría Hemática proporcionados por la responsable del proyecto de investigación. He leído, comprendido toda la información sobre mi participación en este proyecto de investigación, discutí la información proporcionada, de la misma manera realice preguntas las cuales han sido respondidas a mi satisfacción. Entendí que recibiré una copia de este documento (Carta de consentimiento informado), así como la información para contactar a los investigadores involucrados en la este proyecto de investigación.

Nombre completo del Participante

Rúbrica del Participante

Fecha



Huella digital del participante si no sabe escribir

Nombre completo del Investigador
que explicó el documento

Rúbrica del Investigador

Fecha

Nombre completo del Testigo

Rúbrica del Testigo

Fecha

Relación con el participante: _____

Dirección del testigo: _____

(El presente documento es original).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CUESTIONARIO

Toluca, México, a _____ de _____ de 201_____.

Nombre del paciente _____

Medidas antropométricas:

Talla:	Edad:
Peso:	Medida de cadera:
Medida de cintura:	Índice de masa corporal:

Dirección:

Teléfono:

Estado civil:

- ¿Tiene algún familiar que padezca cáncer de mama? Si: _____ No: _____
- Padre: _____ Madre: _____ Hermanos: _____ Otros: _____
- ¿Tiene hijos? Si: _____ No: _____
- ¿A qué edad tuvo a su primer hijo? _____
- ¿Amamantó a sus hijos? Si: _____ No: _____
- ¿Cuándo fue su primer periodo menstrual? _____
- ¿Fecha de último periodo menstrual? _____
- ¿Tiene historia de cirugía de mama? Si: _____ No: _____ ¿Fecha? _____
- ¿Tiene usted alguna seña particular en las mamas? Si: _____ No: _____
- Cicatrices: _____ Lunares: _____ Verrugas: _____ Otros: _____
- ¿Tiene usted algún malestar o dolor? _____
- ¿Presenta usted alguna bolita? Si: _____ No: _____ ¿En qué mama? Izquierda: _____ Derecha: _____



13. ¿Tiene alguna secreción por el pezón? Si: _____ No: _____ ¿De qué tipo?
Lechoza: ___ Sanguinolenta: ___ Purulenta: ___ ¿De qué lado? Izquierda: ___ Derecha: ___
14. ¿Toma usted algún medicamento? _____
15. ¿Toma o tomó pastillas anticonceptivas? ___ Estrógenos: ___ Progesterona: ___ Cortisona: ___
16. ¿Practica usted con regularidad examen de sus mamas? Si: _____ No: _____
17. ¿Cuál es su último grado de estudios? _____
18. ¿A qué se dedica? _____
19. ¿Factores ambientales cerca de su casa? _____
20. ¿Fuma? Si: _____ No: _____ ¿Frecuencia? _____
21. ¿Ingiere bebidas alcohólicas? Si: _____ No: _____ ¿Frecuencia? _____

NOTAS: _____



UAEMex

Universidad Autónoma
del Estado de México



ANEXO III

PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DEL MEDIO DE CULTIVO RPMI 16-40



MEDIO RPMI 16-40

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS:

- Aspecto : Polvo rosáceo y homogéneo
- Tamaño de las Partículas : aproximadamente 20 micrones
- Solubilidad : solución límpida en la concentración de uso 1X
- pH a 25°C (Sin NaHCO₃) : 8,0 + 0,5
- pH a 25°C (Con NaHCO₃) : 8,1 + 0,5
- Osmolaridad (sin NaHCO₃) : 246 + 5%
- Osmolaridad (con NaHCO₃) : 290 + 5

CONSERVACIÓN: almacenar el medio en polvo o preparado líquido entre 2 y 6°C. Si esas condiciones no son mantenidas, podrán ser observadas las siguientes alteraciones:

1. Cambios de color
2. Granulaciones
3. Insolubilidad
4. Alteración de pH
5. Incapacidad de mantener la integridad celular bajo condiciones normales.



ANEXO IV

REACTIVOS Y MATERIALES



METODOLOGÍA ANALÍTICA

REACTIVOS.

- Ácido clorhídrico (HCl) grado ACS J.T.Baker
- Cloruro de sodio (NaCl) grado ACS J.T.Baker
- Cloruro de potasio (KCl) grado ACS J.T.Baker
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) grado ACS J.T.Baker
- Fosfato de potasio monobásico grado (KH_2PO_4) ACS J.T.Baker
- Hidróxido de Sodio (NaOH) grado ACS J.T.Baker
- Medio de cultivo RPMI-1640 con L-glutamina, sin Bicarbonato de Sodio. Sigma
- Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) J.T.Baker
- Agua GR. (Alta pureza)
- Agua libre de dióxido de carbono.
- Agua purificada nivel 1. Agua purificada nivel 2.
- Buffer pH 4.0 J.T.Baker
- Buffer pH 7.0 J.T.Baker
- Buffer pH 10.0 J.T.Baker
- Alcohol anhidro absoluto J.T. Baker
- Dióxido de carbono (CO_2) INFRA
- Antibiótico Ampicilina.
- Antibiótico Estreptomicina.
- Colorante azul de Tripán ó Azul de Tripán. J.T.Baker y/o Avantor.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Puntas para micropipeta de 50 – 250 μL .
- Puntas para micropipetas de 100 – 1 000 μL .
- Tubos cónicos de polipropileno para microcentrífuga de 1.5mL.
- Tubos cónicos de polipropileno para centrífuga de 2.0mL.
- Tubos cónicos de polipropileno para microcentrífuga de 50mL (Falcon).
- Celdas desechables para plástico para espectrofotometría.



- Vaso de Precipitado de 1000mL. Clase A.
- Probeta de 100 y 1000 mL. Para contener.
- Matraz de aforado de 1000mL. Clase A.
- Frasco con tapón de rosca de 1000mL.
- Espátula.
- Barra de agitación magnética.
- Gradillas para tubos cónicos de polipropileno para microcentrífuga.
- Micropipetas de 10 – 200 μ L.
- Micropipetas de 100 -1 000 μ L.
- Cajas Roux de poliestireno con superficie tratada no ventilada sin membrana 25 cm².
- Parrilla de calentamiento y agitación.
- Balanza Analítica XS205 Mettler Toledo.
- Potenciómetro Mettler Toledo MP 225 pH
- Incubadora de CO₂ con transferencia de calor por convección natural. SL Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc
- Centrifuga
- Bomba de vacio
- Equipo de filtración
- Membranas 0.22 μ m
- Jeringas
- Papel aluminio
- Campana de flujo laminar Clase II.
- Microscopio.
- Cámara de Neubauer.
- Autoclave.
- Parafilm.
- Ultracongelador
- Centrifuga Biofuge fresco heraeus