



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de sistemas nanoparticulados de PLGA que contienen análogos y/o derivados del ácido cinámico en línea celular de cáncer de próstata

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN
BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA :

LENIN GARCÍA GUTIÉRREZ

ASESOR DE TESIS

Dr. ENRIQUE ÁNGELES ANGUIANO

COASESOR

Dr. ROBERTO DÍAZ TORRES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación in vitro de la citotoxicidad de sistemas nanoparticulados de PLGA que contienen análogos y/o derivados del ácido cinámico en línea celular de cáncer de próstata.

Que presenta el pasante: Lenin García Gutiérrez

Con número de cuenta: 309087195 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Noviembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano	
VOCAL	M.F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
SECRETARIO	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramirez Noguera	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga

AGRADECIMIENTOS

A la **vida**, por darme esta experiencia, lección y etapa de ella

Agradezco a la **UNAM** como casa de estudios que me abrió sus puertas para cumplir el objetivo de mi formación

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, por ser la cuna de mi formación, lugar de este gran momento y personas que estuvieron presentes en esta etapa de mi vida

A mi **carrera**, por brindarme la oportunidad de ser parte de ella, permitiéndome adquirir los conocimientos de mi formación académica en mi área de interés para mi desarrollo

A cada uno de los **profesores** presentes durante mi desarrollo académico

Doctor Enrique Ángeles, muchas gracias por brindarme la oportunidad de tener un lugar en el laboratorio, por desenvolverme en el a lo largo de 3 años de mi formación y los cuales me han servido para ser capaz de desempeñarme adecuadamente en el laboratorio, por enseñarme que los experimentos, las cosas que uno hace y en las cuales uno se desempeña, salen más porque uno está mentalizado en que los resultados tienen que salir correctamente independientemente de lo que se mencione en los libros y la experiencia que te va dando la práctica.

Pablo Arturo Soriano, muchas gracias por estar siempre ahí. Existen cosas que uno aprende al estar trabajando, que conlleva conocimientos, momentos y experiencias. Que uno le puede exigir más a las personas que pueden dar más, y que siempre hay que subir un escalón de conocimientos y otro de humanidad. Espero compartir más momentos donde podamos aprender juntos y que la vida nos prepare buenas cosas.

Doctor Roberto Díaz, muchas gracias por darme un espacio en su laboratorio por fortalecer mi aprendizaje, confiar en mí. Gracias por ser una guía, por su humildad y sobre todo dedicarles tiempo a las personas que uno quiere.

A la persona que dedican parte de su tiempo que no recuperaran en leer algo de mí

Al **Instituto Nacional de Cancerología** y al grupo del **Doctor Alfonso Dueñas** por brindarme un lugar en su laboratorio, aprendizaje, buenos momentos y una experiencia que jamás olvidare

DEDICADA A...

Mi familia que me apoyo durante mi formación

A mi madre por todo el esfuerzo que pone para que sea una persona de bien, porque día a día me exige para ser mejor. Gracias por el regalo de la vida y las lecciones que tiene que brindarme. Por aguantarme durante estos largos años de mi vida. Gracias por enseñarme a ser independiente. Y por ser la semilla de la flor más bella de las cual pude nacer.

¡Abuelita soy tu nieto!, muchas gracias por siempre darme un taco que comer y un techo donde dormir

A los árboles, que dieron su vida para dejar plasmado este trabajo

Y con mucho amor, un saludo para el amor de mi vida donde quiera que esté.

“Para que pueda surgir lo posible es preciso intentar una y otra vez lo imposible”.

-Hermann Hesse-

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 CÉLULA	2
1.1.1 CICLO CELULAR	2
1.1.2 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	2
1.1.3 CONTROL DEL CICLO CELULAR	3
1.1.4 APOPTOSIS	4
1.1.5 AUTOFAGIA	6
1.1.6 NECROSIS	6
1.1.7 CATÁSTROFE MITÓTICA	6
1.1.8 SENESCENCIA CELULAR	7
1.2 CÁNCER	7
1.3 CARCINOGENÉISIS	8
1.3.1 INICIACIÓN	8
1.3.2 PROMOCIÓN	9
1.3.3 PROGRESIÓN	9
1.3.4 METÁSTASIS	10
1.3.5 CULTIVO CELULAR	10
1.3.6 LÍNEA CELULAR	10
1.3.7 EPIDEMIOLOGÍA	11
1.3.8 FACTORES DE RIESGO	14
1.4 PRÓSTATA	15
1.4.1 ANATOMÍA	15
1.4.2 FUNCIÓN	16
1.5 CÁNCER DE PRÓSTATA	17
1.5.1 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	17
1.5.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	17
1.5.3 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER PROSTÁTICO	17
1.5.4 SIGNOS Y SÍNTOMAS	19
1.5.5 FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER PROSTÁTICO	20
1.5.6 DIAGNÓSTICO	21
1.5.7 TRATAMIENTO	22
1.6 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	23
1.6.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTINEOPLÁSICOS	24
1.6.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA	25
1.7 ÁCIDO CINÁMICO	25
1.7.1 PROPIEDADES QUÍMICAS	25
1.7.2 PROPIEDADES FÍSICAS	26
1.7.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	26
1.7.4 OBTENCIÓN	27
1.7.5 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO CINÁMICO	27
1.7.6 CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL, MODIFICACIÓN DE DÖEBNER	27
1.7.7 REACCIÓN DE CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL, MODIFICACIÓN DE DÖEBNER	27

1.7.8 MECANISMO DE REACCIÓN	28
1.7.9 Usos	29
1.8 NANOTECNOLOGÍA	29
1.8.1 NANOMEDICINA	29
1.8.2 NANOPARTÍCULAS	30
1.8.3 CLASIFICACIÓN DE MATERIALES PARA NANOPARTÍCULAS	31
1.8.4 APLICACIONES TERAPÉUTICAS	32
1.8.5 COMPOSICIÓN	33
1.8.6 PLGA	33
1.8.7 INTERNALIZACIÓN CELULAR	36
1.8.8 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA	39
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GENERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. METODOLOGÍA	42
4.1 PREPARACIÓN Y ELABORACIÓN DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS	43
4.2 OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	44
4.3 RECUPERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	44
4.4 PURIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	44
4.5 DETERMINACIÓN DE CARGA DE LQM	44
4.6 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS	44
4.7 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL Z	44
4.8 PRUEBAS BIOLÓGICAS	45
4.9 ALMACENAMIENTO Y CONGELAMIENTO	45
4.10 CULTIVO CELULAR	45
4.11 PASE CELULAR	45
4.12 ACTIVIDAD CITOTÓXICA IN VITRO DE LOS COMPUESTOS	45
4.13 SIEMBRA	45
4.14 EXPOSICIÓN	46
4.15 TÉCNICA DE EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO	46
4.16 OPTIMIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	47
4.17 DETERMINACIÓN DE IC ₅₀	47
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
5.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN PARA LAS NANOPARTÍCULAS CON LQM	51
5.2 VIABILIDAD CELULAR DE QUERATINOCITOS (HACAT) EXPUESTOS A LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LOS COMPUESTOS LQM 717, 731, 738 Y 755 ESTIMADA POR LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO	53
5.3 VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA (PC-3) EXPUESTOS A LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LOS COMPUESTOS LQM 717, 731, 738 Y 755 ESTIMADA POR LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO	54
5.4 VIABILIDAD CELULAR DE CADA UNA DE LAS LÍNEAS CELULARES: QUERATINOCITOS (HACAT) Y CÁNCER DE PRÓSTATA (PC-3) EXPUESTA AL COMPUESTO LQM 717 ESTIMADA CON LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN AZUL DE TRIPANO	55

5.5 VIABILIDAD CELULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES: QUERATINOCITOS (HACAT) Y CÁNCER DE PRÓSTATA (PC-3) EXPUESTA AL COMPUESTO LQM 731 ESTIMADA CON LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN AZUL DE TRIPANO	58
5.6 VIABILIDAD CELULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES: QUERATINOCITOS (HACAT) Y CÁNCER DE PRÓSTATA (PC-3) EXPUESTA AL COMPUESTO LQM 738 ESTIMADA CON LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN AZUL DE TRIPANO	60
5.7 VIABILIDAD CELULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES: QUERATINOCITOS (HACAT) CÁNCER DE PRÓSTATA (PC-3) EXPUESTA AL COMPUESTO LQM 755 ESTIMADA CON LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN AZUL DE TRIPANO	63
5.8 DETERMINACIÓN DE IC₅₀	66
5.8.1 COMPUESTO LQM 717	66
5.8.2 COMPUESTO LQM 731	68
5.8.3 COMPUESTO LQM 755	69
6. CONCLUSIONES	73
7. PROSPECTIVAS	75
8. REFERENCIAS	75
9. ANEXOS	81
A ANEXO I. CARGA DE NANOPARTÍCULAS	81
B ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	85
C ANEXO III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DETERMINACIÓN DE IC₅₀	86
COMPUESTO LQM 717 EN LÍNEA CELULAR HACAT	86
COMPUESTO LQM 717 EN LÍNEA CELULAR PC-3	86
COMPUESTOS LQM 731 EN LÍNEA CELULAR HACAT	87
COMPUESTOS LQM 731 EN LÍNEA CELULAR PC-3	88
COMPUESTOS LQM 755 EN LÍNEA CELULAR PC-3	89

INTRODUCCIÓN

Es importante la síntesis e investigación de nuevas entidades químicas que molecularmente sean más específicas ante uno de los más importantes padecimientos como lo es el cáncer. Debido a los efectos secundarios que suelen presentarse en el tratamiento de estos padecimientos se necesita la síntesis de nuevas moléculas que presenten actividad contra los diferentes tipos de cáncer que existen y que al mismo tiempo estos resulten menos tóxicas para las células del cuerpo.

Investigación realizada en el CINVESTAV por parte del grupo de investigación del Dr. Saúl Villa Treviño en el 2011, reportaron efecto hepatoprotector del éster fenético del ácido cafeico (CAPE), un compuesto químico fenólico natural que se encuentra en una variedad de plantas, el cual es uno de los componentes del propóleo que principalmente ayuda a mantener limpia la colmena, y del cual se ha reportado actividad como antimutagénico, anticancerígeno, antiinflamatorio e inmunomodulador. El CAPE inhibe el proceso de la hepatocarcinogénesis química, resultando así un excelente candidato para la administración a personas con alto riesgo a desarrollar cáncer. Así mismo, análogos del ácido cinámico que han sido sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán mostraron ser compuestos eficaces y posibles candidatos para combatir el cáncer de mama, cérvix y próstata.

La aplicación de sistemas poliméricos biodegradables en escala nanométrica como sistemas de transporte, entrega y liberación controlada de compuestos ha tenido un gran impacto en el campo de la medicina en los últimos años. Estos sistemas poliméricos biodegradables se han empleado en la terapia o tratamiento de tumores por diversos métodos de encapsulamiento, los cuales permiten por sus características, ser usados como una terapia específica ante el padecimiento de cáncer, y de la misma forma producir menores efectos secundarios; siendo estos menos tóxicos para las células sanas del organismo y más tóxicos ante las células cancerígenas.

El uso de la nanotecnología en la medicina permite obtener nuevos avances y tecnologías, que pueden optimizar el uso de fármacos para su implementación en la quimioterapia. No solo ha logrado ser útil para el tratamiento; permite mejorar el diagnóstico oportuno y detección de cualquier tipo de cáncer. El uso de polímeros biodegradables permite optimizar el efecto que tiene un fármaco y es de suma importancia evaluar estas moléculas con el uso de polímeros biodegradables, permite determinar la actividad que pueden presentar nuevos compuestos ante estos padecimientos, permitiendo realizar los ensayos tanto de compuestos hidrofóbicos como hidrofílicos; solucionando los principales problemas que presentan los compuestos hidrofóbicos con su solubilidad en medios hidrófilos; conociendo la eficacia de estos compuestos. Permite implementar nuevos compuestos que muestren ser excelentes tratamientos que presenten un efecto antitumoral, permitiendo combatir los diversos tipos de cáncer que existen en la actualidad.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Célula

La célula es considerada la unidad básica de la vida. Las células son la base de todos los seres vivos (Scitable, 2016). El cuerpo humano está compuesto por billones de células. Estas proporcionan una estructura para el cuerpo, toman los nutrientes de los alimentos, convirtiendo estos nutrientes en energía y llevan a cabo funciones especializadas. Las células también contienen material hereditario del cuerpo y pueden hacer copias de ellas mismas. Las células presentan diferentes partes y tiene su función; llamadas organelos, los cuales son estructuras especializadas que presentan con funciones específicas dentro de la célula (Medicine, 2016).

1.1.1 Ciclo celular

El ciclo celular de la mayoría de las células consiste en cuatro procesos coordinados: el crecimiento celular, replicación del DNA, distribución de los duplicados cromosómicos y división celular. El ciclo celular se divide en dos partes básicas: mitosis e interfase. Mitosis (división nuclear) es la etapa más importante del ciclo celular, lo que corresponde a la separación de los cromosomas hijas y normalmente termina con la división celular (citocinesis). Sin embargo, la mitosis y citocinesis sólo duran alrededor de una hora, por lo que aproximadamente el 95% del ciclo celular se gasta en la interfase; es decir, el período entre la mitosis. Durante la interfase, los cromosomas se descondensan y se distribuyen por todo el núcleo, por lo que el núcleo parece morfológicamente uniforme. A nivel molecular, sin embargo, la interfase es el tiempo durante el cual tanto el crecimiento celular y el DNA de replicación se producen de una manera ordenada en preparación para la división celular (Cooper, 2000).

1.1.2 Regulación del ciclo celular

La progresión de las células a través del ciclo de división está regulada por medio de señales extracelulares, así como por las señales internas que controlan y coordinan los distintos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular. El control interno del ciclo celular está a cargo de proteínas, cuyas acciones se resumen en series de activaciones e inhibiciones de otras proteínas, que son indispensables durante las fases del ciclo. Además, los diferentes procesos celulares, tales como el crecimiento celular, replicación del DNA y mitosis, todos deben coordinarse durante la progresión del ciclo celular. Esto se logra por una serie de puntos de control que regulan la progresión a través de diversas fases del ciclo celular (Morgan, 2007).

Los principales efectores de esta regulación, son dos: las proteínas que permiten el progreso del ciclo (Alberts, y otros, 2001):

- 1) los complejos cinasa dependiente de ciclina
- 2) dos pequeñas familias de proteínas, las proteínas inhibidoras de cdk's (**CIP**) y las proteínas inhibidoras de cinasa 4 (**INK4**).

Esta red de vigilancia incluye vías bioquímicas que actúan como puntos de control para retrasar o detener la progresión del ciclo celular en respuesta al daño del DNA, son activadas: punto de control G_1 / S , el punto de control intra-S y punto de control G_2 / M .

G_1 / S es el punto de control que inhibe la entrada en la fase S en células G_1 que aún no se han comprometido con la replicación del DNA. El punto de control intra-S impide la iniciación de la replicación del DNA en los orígenes que aún no han sido activados en células en fase S. El punto de control G_2 / M inhibe la entrada en mitosis. Los puntos de control del ciclo celular son reversibles, lo que permite la reanudación de la progresión del ciclo celular después de las señales de las lesiones del DNA se reparen (Hanahan, 2011).

1.1.3 Control del ciclo Celular

Las células se reproducen para posibilitar el crecimiento corporal y para reemplazar a aquellas que desaparecen por envejecimiento o muerte programada; también lo hacen durante ciertas situaciones patológicas. En la célula existen mecanismos para coordinar los procesos de síntesis del núcleo y el citoplasma, así mismo para determinar el inicio y la conclusión de cada una de las fases del ciclo celular.

Poco antes de finalizar la fase G_1 ; duración variada en los distintos tipos celulares, existe un momento en la que la célula comienza a dividirse, la cual es inducida por la presencia de moléculas proveniente de otras células. En el control de la división intervienen 2 tipos de moléculas:

- 1) Las **ciclinas**, cuyo nombre se debe a que el curso de cada ciclo celular alterna un periodo de síntesis creciente seguido por otro de rápida degradación.
- 2) Las **quinasas dependientes de ciclinas**, que al interactuar con las ciclinas fosforilan y activan a las moléculas responsables de la división celular.

Existen varias clases de ciclinas, cuyas concentraciones se elevan o descienden dependiendo de las fases del ciclo celular. Tomada la decisión de dividirse, la célula deja atrás la fase G_1 e ingresa a la fase S, es decir, comienza a replicar el DNA, la cual se activa cuando ciclina G_1 activa a la quinasa Cdk2, iniciando una cadena de fosforilaciones sucesivas a proteínas intermediarias, culminando con la activación de moléculas responsables de la replicación del DNA. A partir del momento en que Cdk2 y ciclina G_1 componen un complejo proteico denominado Factor promotor de la fase S (SPF) induce la apertura de orígenes de replicación y activa a las moléculas involucradas en la síntesis del DNA, como DNA polimerasa y la helicasa (Charlotte W. Pratt, 2012).

Antes de la fase S la célula controla el estado de sus moléculas de DNA, mediante una proteína citoplasmática llamada **P53** (por su peso molecular de 53 kDa). El gen **p53** que la codifica, pertenece al grupo de genes conocidos como supresores de tumores. La P53 se comporta como factor transcripcional que promueve la expresión de proteínas de regulación **P21** y **P16**, que bloquean la actividad de Cdk2, oponiendo a la ciclina G_1 e inhibiendo la

replicación del DNA. Provoca la muerte celular y desaparición del DNA dañado (Morgan, 2007).

En cierto momento de la fase S la concentración de ciclina G, empieza a declinar, el SPF deja de producirse, y es degradada por el proteosoma para desaparecer en fase G₂, manteniéndose constante la Cdk2. La fase G₂, provee a la célula un lapso durante el cual actúan mecanismos de seguridad para controlar si las moléculas del DNA han completado su replicación, permitiendo detectar errores en la replicación y cuando estos existan, se inicie la reparación de las secuencias dañadas, en la fase G₂ se completa la duplicación de los componentes citoplasmáticos.

Superados tales controles, comienza la fase M, donde intervienen la proteína de control de la división celular (**Cdc2**) y la **ciclina M**, sintetizándose en fase G₂. Estas comprenden un complejo denominado Factor promotor de la fase M (MPF). Activada por ciclina M, la Cdc2 fosforila directamente a las quinasas intermediarias, que regulan la estabilidad de los filamentos del citoesqueleto, los laminofilamentos de la lámina nuclear, a la H1, etc.

Estos efectos se revierten concluyendo la división celular, al desactivarse Cdc2, al desactivarse la concentración de ciclina M declina impidiendo estar unida con la quinasa. Esta disociación del MPF da lugar a la anafase. El inicio de la anafase dependería de un complejo promotor de la anafase (APC) o cicloso, promoviendo la degradación de la ciclina M. Propiciando la destrucción de las proteínas centroméricas que mantienen unidas las cromátidas (Alberts, y otros, 2001).

Las células hijas derivadas de la mitosis ingresan en fase G₁ de la interfase y si son inducidas por ciertos factores, repiten el ciclo seguido por la célula predecesora y vuelven a dividirse. La alteración de algunos genes, como los oncogenes puede llevar a la pérdida de los mecanismos normales que detienen la proliferación celular, así mismo; protooncogenes producen un incremento de la proliferación. Por lo tanto, estos mecanismos de control son importantes para evitar daños al DNA y poder inducir a la célula a muerte programada.

1.1.4 Apoptosis

El término apoptosis fue introducido por *Kerr et al. (1972)* para describir las características morfológicas de las células atravesando la degeneración en una variedad de situaciones patológicas (Wride, 1995). Un proceso de muerte celular evolutivamente conservado que remueve a las células no deseadas, dañadas o perjudiciales. Este proceso implica el encogimiento celular, separación, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y zeiosis, proceso formación de vesículas en su superficie de la membrana plasmática (blebbing, budding). Las células apoptóticas son envueltas por los macrófagos antes de su ruptura.

1.1.4.1 Activación de caspasas

La apoptosis es inducida por la acción de las caspasas, las cuales son proteasas de cisteína. Existen por lo menos 17 caspasas descritas en mamíferos. El proceso de apoptosis se produce a través de la activación de un subconjunto de estos, llamadas caspasas ejecutoras (Caspasa-3, Caspasa-6 y Caspasa-7 en mamíferos) una vez activadas cortan diversos sustratos celulares que producen restos de aspartato y son asociados con la inducción de la muerte celular. Las caspasas ejecutoras están presentes en la célula de forma inactiva (forma dimérica), que se activa cuando corta los residuos de aspartato específicos, formando la enzima activa, que es responsable de los cambios asociados con apoptosis. Las caspasas iniciadoras presentes en la célula son monoméricas y contienen dominios, que forman plataformas de activación con las caspasas, para activar una vía de señalización específica de la apoptosis (Cadenas, 2010).

La célula presenta diferentes vías de señalización que controlan el equilibrio de sobrevivencia o muerte. La apoptosis depende de la presencia o ausencia de señales específicas que promueven la muerte celular. Existen dos vías principales de la apoptosis, **Vía intrínseca o mitocondrial** y la **Vía extrínseca o del receptor de muerte**.

1.1.4.2 Vía Extrínseca

Esta vía de señalización se inicia por ligandos y receptores de muerte transmembranal, los receptores pertenecen al gen receptor de la Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Algunos de estos ligandos son: Fas ligando (FasL), TNF-alfa, Apo3L y Apo2L; estos ligandos se unen a sus correspondientes receptores tales como, receptor de Fas (FasR), TNFR1, DR3, DR4 y DR5. La traducción de señales implica proteínas específicas como las caspasas, que desencadenan varias señales como parte del proceso de muerte celular (Masyelly Rojas, 2009).

1.1.4.3 Vía Intrínseca o mitocondrial

Esta vía apoptótica responde a diversos grupos de eventos iniciadores, incluyendo fármacos citotóxicos, inhibición de factores de crecimiento, activación de oncogenes, choque térmico, estrés oxidativo y daño al DNA. Esta vía obtiene su nombre porque la mitocondria es el organelo central que coordina las decisiones, así como la ejecución de las mismas; involucrando la permeabilización mitocondrial de la membrana externa, liberando al citosol moléculas que facilitan la ejecución de la muerte celular programada, permitiendo la interacción con el citocromo C, esencial para la activación de caspasas y apoptosoma.

El reconocimiento de estas células en proceso apoptótico, permite que estas sean fagocitadas, reduciendo al mínimo la inflamación, reciclando aquellos organelos que presentan un correcto funcionamiento, mostrándose en la figura 1 las etapas de la apoptosis.



Figura 1. Fases de la apoptosis, obtenida de <http://www.wisegeek.com/what-is-the-relationship-between-apoptosis-and-cancer.htm>

1.1.5 Autofagia

La autofagia o auto-alimentación celular, es un proceso que usan las células para recoger las proteínas intracelulares, citoplasma y organelos; entregarlos a los lisosomas donde son degradados y reciclados (Mizushima N, 2011). La autofagia fue descubierta por medio de microscopia electrónica en células en condiciones de bajas concentraciones de nutrientes, donde el autofagosoma secuestra porciones al azar del citoplasma, este descubrimiento permitió ganar el premio nobel de Medicina o Fisiología 2016 al científico japonés Yoshinori Ohsumi, por su aportación de los mecanismos de la degradación y reciclaje de los componentes de las células, este descubrimiento condujo a la comprensión de un modelo por el cual la célula recicla su propio contenido (Ohsumi, 2014)

1.1.6 Necrosis

La necrosis es generalmente definida de una manera negativa, como un tipo de muerte celular que implica la ruptura de la membrana plasmática, sin las características de la apoptosis y sin vacuolización autofágica masiva (L Galluzzi, 2007).

1.1.7 Catástrofe mitótica

Catástrofe mitótica detecta daño mitótico y dirige las células defectuosas hacia uno de los tres posibles destinos antiproliferativos. Las células mitóticas defectuosas pueden activar la maquinaria de muerte celular y someterse a la muerte en la mitosis, cuando se mantienen elevados los niveles de ciclinas, las cuales son enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular (MargaretM.McGee, 2015). En la Tabla 1, se presentan los aspectos morfológicos presentes en cada uno de los modelos de muerte celular

Tabla 1. Aspectos morfológicos de los diferentes modelos de muerte celular (L Galluzzi, 2007)

Modelos de muerte celular	Aspectos morfológicos característicos
<i>Apoptosis (tipo 1)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Redondeo de la célula • Reducción del volumen celular y nuclear (picnosis) • Fragmentación celular (cariorrexis) • Pequeñas modificaciones en organelos citoplasmáticos
<i>Autofagia (tipo 2)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Zeiosis de la membrana plasmática • Falta de condensación de la cromatina • Vacuolización masiva del citoplasma (doble con membranas de vacuolas autofágicas)
<i>Necrosis (oncosis) (tipo 3)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hinchazón de orgánulos citoplasmáticos • Condensación moderada de la cromatina
<i>Catástrofe mitótica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Micronucleación • Multinucleación

1.1.8 Senescencia celular

La senescencia celular se describió inicialmente como el fenómeno de divisiones celulares limitadas que presentan las células normales en cultivo, que se puede sufrir durante el cultivo a largo plazo. Más tarde se encontró que la senescencia puede ser inducida por diversos factores de estrés. La senescencia desempeña un papel importante en el envejecimiento del organismo. También es considerado como un mecanismo de supresión tumoral que funciona mediante la limitación de la proliferación celular aberrante *in vivo*. La senescencia es considerada como un mecanismo que contribuye al control de la proliferación celular y represión de la tumorigénesis (Irina Fridlyanskaya, 2015). La senescencia celular es un programa clave que puede ser inducido y desempeña un papel importante en la restricción de la propagación de dañados y defectos celulares (Lowe, 2015).

1.2 Cáncer

El cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Otros términos empleados son tumores malignos y neoplasias. Una característica definitoria del cáncer es la rápida proliferación de células anormales que crecen más allá de sus límites normales, y que luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos. Este proceso se conoce como metástasis. La metástasis es la causa principal de muerte por cáncer (Arja, 2015).

El riesgo general de cáncer humano está determinado por las complejas interacciones entre la genética del hospedero y la exposición al medio ambiente. En la exposición a un agente cancerígeno, se promueve una cadena de señales que genera transformación de las células normales en células cancerosas. Este proceso se conoce como la *carcinogénesis*, y agentes causantes de cáncer se conocen como agentes carcinógenos. Una vez alcanzado esta etapa de progresión las células cancerígenas pueden pasar a formar metástasis. El proceso de

convertir una célula normal en una célula metastásica que amenazan la vida se conoce como la progresión tumoral (aecc, 2016).

Los principales tipos de cáncer incluyen:

- Leucemia (cáncer de la sangre de formación de tejidos)
- Linfoma y mieloma (cáncer de células del sistema inmunitario)
- Carcinoma (cáncer de los tejidos de la piel y de los órganos internos)
- Sarcoma (cáncer de los tejidos blandos o de otro tejido conectivo); tales como músculos, tendones, nervios y tejidos alrededor de las articulaciones

1.3 Carcinogénesis

Es un proceso en el que una célula normal o sana sufre cambios en sus niveles genéticos seguido de alteración de sus funciones básicas. Es el origen, la producción o el desarrollo de cáncer a través de cambios genotípicos y fenotípicos que perturban el equilibrio normal entre la proliferación celular y la muerte celular (<http://cancerelltreatment.com/>, 2016). La carcinogénesis es una serie de eventos moleculares que subyacen de la iniciación, promoción y progresión del tumor y los cuales se describen a continuación.

1.3.1 Iniciación

El desarrollo del cáncer depende de múltiples factores, tanto la genética del individuo como dependientes del ambiente y del estilo de vida que lleva cada persona. Estos factores juegan un papel importante en la señalización intracelular que pueden desencadenar la proliferación anormal de las células o conservar la homeostasis.

Algunos de las principales alteraciones que pueden ocasionar cambios en la proliferación celular, se mencionan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales alteraciones genómicas y epigenómicas asociadas al cáncer (Valdespino-Castillo, 2011)

Alteraciones genómicas	Alteraciones epigenómicas
Mutaciones, inserciones, deleciones, etc.	Metilación de los dinucleótidos CpG
Cambio en el número de copias: amplificaciones, duplicaciones, pérdida de la heterocigosidad	Patrones postraduccionales y composición de las histonas
Re-arreglos génicos	Patrones de RNAs no-codificantes
Re-arreglos intra e intercromosómicos	Enrollamiento de la cromatina
Alteraciones en regiones no codificantes	Posicionamiento de los nucleosomas
	Patrones de complejos proteínicos que regulan la expresión génica
	En las concentraciones y afinidad de los factores de transcripción

Los carcinógenos pueden agruparse en: carcinógenos físicos, biológicos y químicos. Pocos carcinógenos actúan directamente sobre el DNA, y los que cumplen con esta condición son los carcinógenos físicos, como varios tipos de radiación (UV y radiaciones ionizantes). Carcinógenos biológicos se refiere a las infecciones víricas y bacterianas que se han asociado con el desarrollo del cáncer (virus del papiloma humano [VPH] y el virus de la hepatitis B [VHB]). Son varios los carcinógenos químicos que se pueden agrupar en: metales pesados, productos de combustión orgánicos, toxinas y hormonas. La mayoría lo hacen después de ser procesados metabólicamente en el hígado, por el citocromo p-450 oxidasa. No todas las sustancias que participan en el desarrollo del cáncer son carcinógenos directos o mutágenos (iniciadores del tumor), pueden ser promotores del tumor y activar a la proteína cinasa C. Uno de los efectos de las sustancias promotoras del tumor, es inducir la respuesta inflamatoria crónica local que causa la secreción de factores de crecimiento y de proteasas, las cuales estimulan directa o indirectamente la división celular. Algunos agentes químicos ambientales aceleran la tasa de desarrollo y progresión del cáncer, los cuales funcionan como iniciadores y promotores; no obstante, muchos factores que favorecen el desarrollo del cáncer quedan aún por identificar (Erika L. Abel, 2015).

1.3.2 Promoción

Durante la fase de promoción en la carcinogénesis, los estímulos de crecimiento y otros factores promueven la expansión clonal de las células iniciadas. Esta etapa se caracteriza por la expresión de genes alterados y la proliferación de las células iniciadas. Los mediadores inflamatorios u otros factores estromales pueden mediar estos efectos, proporcionando un entorno permisivo para el crecimiento del tumor. Estos promotores no interactúan directamente con el DNA y desencadenan efectos biológicos sin ser activado metabólicamente. Promotores retrasan la inhibición natural de las células quiescentes o en G₀ por uniones comunicantes.

Por lo tanto, la promoción es una etapa reversible, después de la desaparición de un promotor, induciendo la regresión en la proliferación celular, regulando la apoptosis. Es una etapa que puede ser moldeado por factores fisiológicos y por lo tanto limitar el alcance de la carcinogénesis. Algunos agentes promotores son específicos para un tejido particular, pero otros actúan simultáneamente sobre varios tejidos.

No todas las células expuestas a promotores toman parte en la fase de promoción, sólo las células que son estimuladas para dividirse, que son indiferenciadas y han sobrevivido a la apoptosis, puede contribuir a la inestabilidad entre el crecimiento y la muerte celular, dando lugar a la aparición de una neoplasia maligna (Trosko 2001).

1.3.3 Progresión

La etapa final de la carcinogénesis se denomina progresión. El tumor original aumenta su masa, las mutaciones se acumulan, se producen la invasión y posterior migración o metástasis. Es crucial para la progresión de tumores sólidos invadir el estroma circundante, entrar al torrente sanguíneo, y la extravasación para colonizar sitios distantes.

Las células se separan del tumor primario, la regulación de la adhesión celular se ve alterada debido a la represión de la expresión de E-cadherina. Posteriormente, las células deben adquirir la movilidad y la capacidad de invadir la membrana basal del estroma y los vasos sanguíneos circundantes. La invasión requiere la acción de enzimas de degradación tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Estos cambios se denominan colectivamente como la transición epitelio-mesenquimal (EMT). Una vez establecida, la colonia metastásica debe desarrollar una nutrición adecuada y el suministro de oxígeno a través de la estimulación de la angiogénesis (Luisa Fernanda Zúñiga Cerón, 2014).

1.3.4 Metástasis

La metástasis es definida como la diseminación de células neoplásicas a sitios secundarios cercanos o lejanos donde proliferan para formar una masa. Se reconoce que las metástasis representan un subconjunto de células que han dejado el tumor primario, que son conductualmente distintas de las células restantes en el sitio de origen del tumor, y los mecanismos moleculares subyacentes a las diferencias fenotípicas que caracterizan a una célula metastásica aún están siendo dilucidados (Erika L. Abel, 2015).

1.3.5 Cultivo celular

El cultivo celular es el proceso por el cual crecen y se mantienen células en condiciones controladas de manera viables o vivas, fuera de un animal vivo. Se describen tres categorías de células usadas en los experimentos de cultivo: Las líneas celulares inmortalizadas, cultivos de células primarias, y células madre (Shieh, 2015).

1.3.6 Línea celular

Una línea celular es un cultivo celular permanentemente establecido que proliferará indefinidamente dado un medio fresco y espacio adecuado. Las líneas celulares se diferencian de estirpes celulares normales, ya que estas han sido inmortalizadas (Pour, 2001). Existe una colección de líneas celulares, que ofrece una enorme variedad de células. Las líneas que se describen a continuación, están involucradas en la experimentación. Debido a que pertenecen al tejido epitelial de un órgano permiten ser adecuadas para la evaluación del experimento.

1.3.6.1 Características de línea celular de cáncer de próstata (PC-3) (ATCC, 2012)

Organismo: Humano (*Homo sapiens*)

Tejido: Próstata

Morfología: Epitelial

Propiedades del cultivo: Adherencia (las células forman agrupaciones en agar blando y se pueden adaptar a crecimiento en suspensión)

Enfermedad: Grado IV, adenocarcinoma

Género: Masculino

Edad: 62 años

Origen étnico: Caucásico

El PC-3 fue iniciada a partir de la metástasis ósea de un adenocarcinoma grado IV de un varón de 62 años caucásico. La línea es casi triploide con un número modal de 62 cromosomas. Existen casi 20 marcadores cromosomales comúnmente encontrados en cada célula; y normal N2, N3, N4, N5, N12 y N15 no se encuentran.

1.3.6.2 Características de línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT (Boukamp, 1988)

Organismo: Humano (*Homo sapiens*)

Tejido: Queratinocito

Fenotipo: Adherencia, transformado

Cultivo Primario: Si

Enfermedad: no tumoral

HaCaT es la primera línea de células epiteliales permanente de la piel humana adulta que exhibe una diferenciación normal, el cariotipo aneuploide. La identidad de la línea HaCaT con el tejido de origen fue probada por la huella de DNA utilizando sondas minisatélite hipervariable los cuales son zonas repetitivas de DNA en ciertos motivos, repitiéndose entre 5-50 veces. Las características de la línea celular HaCaT documentan claramente que la transformación espontánea de queratinocitos humanos adultos puede ocurrir *in vitro* y se asocia con alteraciones cromosómicas secuenciales, aunque no obligatoriamente ligada a defectos importantes en la diferenciación.

1.3.7 Epidemiología

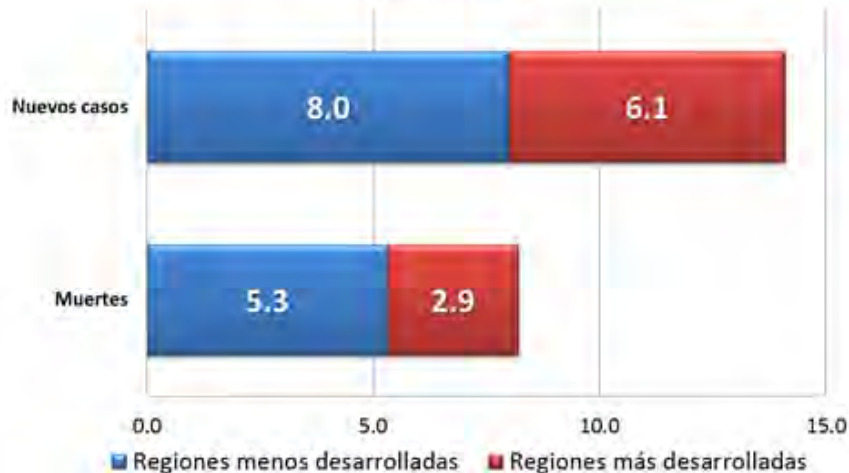
1.3.7.1 Epidemiología mundial

El cáncer es uno de los problemas que se ven reflejados a nivel mundial. Las estadísticas presentadas mundialmente se mencionan mediante GLOBOCAN, 2012 (año más reciente con información disponible):

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, el cual afecta a países desarrollados, como a países en desarrollo; se le atribuyen 8 millones de muertes en países menos desarrollados. Sin embargo, en países desarrollados es un problema importante ya que presenta 6.1 millones de muertes anuales, que sigue siendo un índice muy alto, los cuales se pueden observar en la Gráfica 1.

Número de casos y muertes de cáncer en el mundo en el 2012

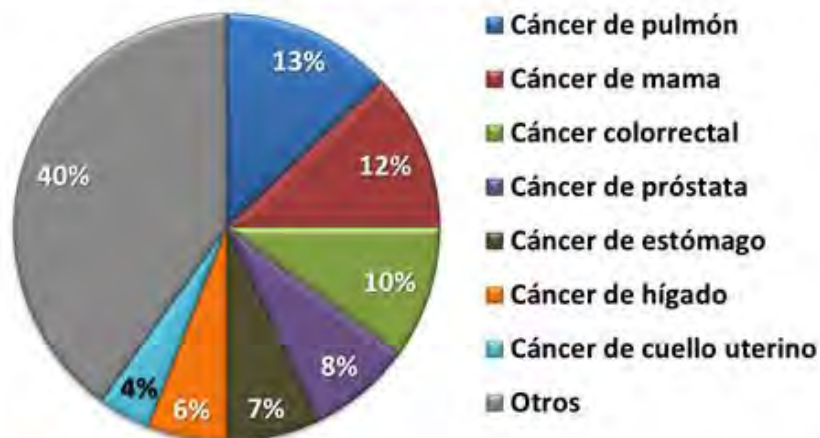
(en millones)



Gráfica 1. Número de casos y muertes por cáncer (GLOBOCAN, 2012)

Los tipos de cáncer que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, mama, colorrectal, próstata, estómago, colon e hígado. Los tipos más frecuentes de cáncer son diferentes en el hombre y en la mujer. Los cuales se mencionan en la Gráfica 2 con sus correspondientes porcentajes.

Los cánceres más comunes en el mundo en el 2012



Gráfica 2. Porcentaje de los tipos de cáncer más común (GLOBOCAN, 2012)

Entre los hombres: Pulmón, próstata, estómago, hígado y colorrectal.

Entre las mujeres: Mama, pulmón, cuello uterino, estómago y colorrectal.

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios (índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol), por lo tanto, pueden prevenirse. Las infecciones que pueden provocar cáncer, son responsables del 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medianos y del 7% en los países desarrollados.

El tabaquismo es el factor de riesgo que por sí solo provoca un mayor número de casos y a nivel mundial causa aproximadamente un 22% de las muertes por cáncer y un 71% de las muertes por cáncer de pulmón. El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Se prevé que los casos anuales de cáncer en estos continentes aumenten 14 millones de 2012 en los 10 años posteriores.

1.3.7.2 Epidemiología nacional

En 2013, el cáncer de órganos hematopoyéticos fue la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en población de 0 a 19 años (62% en las mujeres y 58.7% en los hombres). La tasa más alta de letalidad hospitalaria en población de 0 a 19 años en 2013 se ubica en las mujeres de 15 a 19 años. En la población de 0 a 19 años, la tasa más alta de mortalidad, se debe a órganos hematopoyéticos. En 2013, para hombres y mujeres de 20 años y más, el cáncer de órganos digestivos (25%) y de mama (29.5%), son las principales causas de morbilidad hospitalaria por neoplasias, respectivamente.

En la población de 20 años y más, la tasa de letalidad hospitalaria por tumores malignos aumenta conforme se incrementa la edad y llega a 20.99 de cada 100 en las personas de 80 y más años en 2013. Del total de tumores malignos en la población de 20 años y más, los de órganos digestivos son la primera causa de mortalidad, con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2016).

Por cada 100 mil habitantes para cada grupo de edad

Tumores malignos	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
Hombres								
Órganos digestivos	3.45	12.87	29.87	73.37	126.92	189.02	208.74	150.20
Órganos genitales masculinos	0.79	0.91	3.42	21.21	57.12	113.51	154.88	145.21
Órganos hematopoyéticos	15.54	12.93	17.22	21.79	29.85	35.20	39.19	36.91
Tejido linfático y afines	9.18	10.00	14.72	26.46	41.33	44.87	47.46	32.87
Órganos respiratorios e intratorácicos	1.81	2.60	5.80	21.07	39.95	76.06	101.64	78.40
Células germinales (testículo)	22.25	14.17	4.96	3.15	2.39	3.36	2.81	3.37
Mujeres								
De mama	4.56	37.75	108.48	171.13	180.71	175.88	142.30	81.25
Órganos genitales femeninos	10.76	33.39	64.42	84.97	109.76	108.36	87.30	54.89
Órganos digestivos	4.16	11.57	28.59	66.23	95.55	128.72	159.57	115.00
Células germinales (ovario)	5.14	8.93	23.54	34.11	36.34	39.55	34.42	16.35
Órganos hematopoyéticos	9.53	10.48	13.99	24.19	27.18	30.89	31.65	26.14
Tejido linfático y afines	6.69	7.90	9.93	21.46	29.01	39.43	43.65	28.85

Tabla 3. Tasa de morbilidad hospitalaria en población de 20 años y más por tumores malignos, según grupo de edad para cada tipo de cáncer y sexo (SSA, 2015)

Sin embargo, en los tumores malignos en órganos genitales masculinos no presentan una alta tasa en edades < 20 años, al aumentar los grupos de edad, empieza un aumento considerable de personas afectadas por estos padecimientos, las cuales se pueden observar en la Tabla 3.

1.3.8 Factores de riesgo

Cualquier parte del cuerpo es susceptible de verse afectada, de forma tal que existen más de 100 tipos de esta enfermedad. No existe una causa directa que origine la aparición de cáncer, sino que es el conjunto de alteraciones que desencadenan la aparición de este. A través del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), clasifica los agentes cancerígenos en tres grandes grupos (INEGI, 2016):

- Cancerígenos físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- Cancerígenos químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
- Cancerígenos biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos.

Los hábitos que presenta cada persona en su vida diaria afectan incrementando la probabilidad que una persona puede presentar para padecer cierto tipo de cáncer, algunos de esos se describen a continuación.

1.3.8.1 Tabaquismo

El consumo de tabaco sigue siendo el factor más importante y evitable para determinar el riesgo de cáncer. Cáncer de pulmón, vejiga, esófago, páncreas, útero, y cánceres de la cavidad orofaríngea, han sido asociados con el consumo de tabaco. Aproximadamente el 90 % de todas las muertes por cáncer de pulmón se puede atribuir al consumo de tabaco. El humo del tabaco es una mezcla compleja de productos químicos, 55 de los cuales se sabe o se sospecha carcinógenos humanos (Hecht, 2010).

1.3.8.2 Consumo de bebidas alcohólicas

El riesgo de cáncer aumenta de una manera dependiente de la dosis, y cuanto mayor es la cantidad de alcohol consumido, mayor es el riesgo de desarrollar cáncer. Varios mecanismos biológicos explican la carcinogenicidad del alcohol; entre ellos el etanol y acetaldehído, su metabolito genotóxico juegan un papel importante y están asociados con cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe, esófago, hígado, colon y recto (Romieu, 2015).

1.3.8.3 Dieta

Una dieta saludable para la prevención del cáncer es aquella que permite a la persona, de la forma más sencilla tener un peso normal; que sea rica en frutas, verduras, granos integrales y legumbres; bajas cantidades de carne roja, moderar el consumo de carnes procesadas y limitar el consumo de sal. Además, una dieta saludable se caracteriza por evitar o limitar el consumo de bebidas azucaradas (Romieu, European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer, 2015).

1.3.8.4 Ocupación

Se han identificado muchos carcinógenos presentes en la exposición laboral. Estudios epidemiológicos humanos destacan la potencia de los carcinógenos químicos y físicos, así como la falta de preparación y protección ante estos en el trabajo (Burwell, 2014). Los trabajadores están expuestos a varios carcinógenos; el uso de sustancias químicas que están presentes en las industrias, así mismo los subproductos que se forman en la combustión tales como el monóxido de carbono, y su exposición constante en el trabajo son un importante factor a considerar. El uso de radiación, por las personas del sector salud, así como el manejo de instrumentos de cuantificación que emitan este tipo de radiación deben ser un problema constante que se debe tener en cuenta al ser factores de riesgo continuo, tales como la exposición a rayos X que están involucrados en el diagnóstico de forma cotidiana.

1.3.8.5 Causas de cáncer por agentes infecciosos

Virus específicos, parásitos y bacterias ahora se asocian con cánceres humanos específicos. Existen tres mecanismos principales por el cual un agente infeccioso puede causar un cáncer, que implica la iniciación, así como la promoción de la carcinogénesis.

El primero y el más común, emerge cuando un agente infeccioso causa una infección persistente con inflamación crónica. Esto puede resultar en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por los macrófagos en el sitio de la infección. Estas moléculas reactivas pueden dañar el DNA y las proteínas, así como las membranas y contribuir a la carcinogénesis (Howley, Peter M., 2015).

Un segundo mecanismo implica la participación directa del agente infeccioso en la transformación de la célula a través de la activación de vías de oncogenes o la inactivación del gen supresor de tumores.

Un tercer mecanismo, relevantes para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la infección puede resultar en la inmunosupresión y el reconocimiento de las células infectadas o transformadas por el sistema inmunitario (Howley, Peter M., 2015).

En el siguiente punto se hablará de uno de los principales órganos afectados por este padecimiento. El cual afecta a un alto porcentaje de hombre en todo el mundo.

1.4 Próstata

1.4.1 Anatomía

La glándula prostática se encuentra sólo en los hombres, justo debajo de la vejiga y delante del recto. El tubo que lleva la orina y el líquido seminal (la uretra) pasa por el centro de la próstata. La próstata contiene células que producen parte del líquido seminal que protege y nutre a los espermatozoides. Produce el 20% del volumen del semen (aecc, 2016).

Su peso normal es de 18 g. Mide alrededor de 3.5 cm en su base y aproximadamente 2.5 cm vertical y anteroposterior (Michel Latarjet, 2008). El tamaño de la próstata cambia con la edad. En los hombres más jóvenes, que es aproximadamente del tamaño de una nuez, pero

puede ser mucho mayor en los hombres mayores. El crecimiento está impulsado por las hormonas masculinas (llamadas *andrógenos*) como la testosterona.

En la próstata se distinguen tres zonas:

- a) Zona de transición, correspondiente al 10% de la glándula, ubicada en la base y en relación con la uretra y vejiga
- b) Zona central, correspondiente al 20% de la glándula, ocupa la base en relación con las vesículas seminales
- c) Zona periférica, corresponde al resto de la glándula (70%)

Las arterias que irrigan la próstata nacen de la arteria ilíaca interna o arteria hipogástrica. Los linfáticos drenan hacia los ganglios ilíacos externos, hipogástricos medios e inferiores, sacros laterales y prevesicales.

La glándula prostática está formada en su mayor parte por células secretoras, de las que derivan los adenocarcinomas, que son los tumores más frecuentes de este órgano. Dichas células secretan fosfatasa ácida y poseen antígeno prostático específico, utilizado en la identificación de tumores derivados de estas células (Rosenberg, 2016).

1.4.2 Función

La próstata secreta un líquido poco denso, lechoso, que contiene múltiples sustancias producto de secreción de las células prostáticas como son:

Ácido cítrico: se forma en las células epiteliales de la próstata a partir de ácido aspártico y glucosa, el cual se comporta como un potente fijador de iones metálicos.

Poliaminas: son pequeñas moléculas cargadas positivamente, involucradas en diversos procesos fisiológicos relacionados con la proliferación y el crecimiento celular, algunas investigadas como marcadores en cáncer de próstata. Las poliaminas son enzimáticamente oxidadas por diaminoxidasa para formar aldehídos tóxicos para los espermatozoides y las bacterias; tales aldehídos son responsables del olor del semen y pueden tener efecto protector del tracto genitourinario contra las infecciones.

Zinc: La próstata contiene la mayor concentración de zinc y responsable de sus altos niveles en el líquido seminal -140mg/ml-. Sugiere que tiene importancia como factor antibacteriano prostático (Leal, 2001).

Antígeno prostático específico (PAS): glucoproteína con peso molecular de 33,000 daltons, casi exclusiva de las células epiteliales de la próstata y formada por 240 aminoácidos. Posee actividad tripsinógena y quimiotripsinógena, las cuales producen la lisis del coágulo seminal. El PAS permite liberar cininas ayudando a incrementar la motilidad espermática y su capacidad para penetrar el moco, además de inducir la contracción del músculo liso (Fernando, 2007).

Durante la emisión, la cápsula de la próstata se contrae en paralelo con las contracciones del conducto deferente, de forma que el líquido poco denso y lechoso de la próstata contribuye aún más al volumen de semen. Este líquido es ligeramente alcalino, importante en la fecundación del óvulo, esto ayuda a la sobrevivencia de los espermatozoides ya que el líquido del conducto deferente es relativamente ácido por la presencia de ácido cítrico y los productos del metabolismo de los espermatozoides, los cuales inhibirían la fertilidad. Además, las secreciones vaginales de las mujeres son ácidas (pH 3.5-4). En consecuencia, el líquido prostático ayuda a neutralizar la acidez producida por estos líquidos, facilitando la movilidad, motilidad y fertilidad de los espermatozoides (Hall, 2011).

1.5 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es un tumor maligno que se origina en las células de la glándula prostática y que empieza a crecer de forma descontrolada. La mayor parte de los carcinomas prostáticos se originan en la zona periférica de la glándula. La próstata rodea a la uretra, el cual acarrea orina y semen, por lo tanto, cualquier cambio en la próstata causa problemas con la eliminación de orina y correcta producción del semen (<http://cancerelltreatment.com/>, 2016).

1.5.1 Etiología del cáncer de próstata

Desde el punto de vista etiológico, se considera que el cáncer de próstata es una enfermedad multifactorial. La unidad funcional de la próstata es el acino, compuesto por elementos epiteliales y estromales, separados por una membrana basal. El compartimiento epitelial está conformado por células glandulares epiteliales, células basales, neuroendocrinas, linfocitos y macrófagos. El cáncer prostático se origina por el crecimiento clonal de una célula epitelial alterada en su genoma (Álvarez-Blanco, 2008).

1.5.2 Epidemiología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos. Este ocupa el cuarto lugar de todas las enfermedades cancerígenas y el segundo más común en hombres. El 70% se presentan en hombres de países desarrollados.

En el 2014 se diagnosticaron alrededor de 233,000 nuevos casos, de los cuales 29,480 serán mortales. Aproximadamente 1 de cada 7 hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en el transcurso de su vida. Se estima que 6 de cada 10 casos, se diagnostican en hombres de 65 años o más. En pocas ocasiones se presenta antes de los 40 años. La edad promedio en la que se diagnóstica, es de 67 años (IMSS, 2015).

1.5.3 Clasificación del cáncer prostático

Existen varias formas de clasificar al paciente con cáncer de próstata, dependiendo de:

- Extensión del tumor; o también conocida como Tumor, Nódulo, Metástasis (TNM)
- Grado histopatológico (Gleason)
- Estado clínico o histopatológico

- Riesgo

1.5.3.1 Clasificación por TNM

La clasificación se establece: Tumor, Nódulo, Metástasis (TNM), en donde la evaluación inicial consiste en determinar el estadio local del tumor. Se utiliza la “T” más una letra o número (0 a 4) para describir el tamaño y la ubicación del tumor cuando no se permite la evaluación, se maneja un “x” después de la “T”. Por medio de la cual se plantea el tratamiento más adecuado (Gleason, 1966).

T: Tumor primario

- Tx No se puede evaluar el tumor primario.
- T0 No hay evidencia del tumor primario.
- T1 Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen.
 - ◆ T1a Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido resecado.
 - ◆ T1b Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor del tejido resecado.
 - ◆ T1c Tumor identificado mediante biopsia.
- T2 Tumor confinado en la próstata.
 - ◆ T2a El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos.
 - ◆ T2b El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos
 - ◆ T2c El tumor abarca ambos lóbulos.
- T3 Tumor que se extiende más allá de la cápsula prostática.
 - ◆ T3a Extensión extracapsular unilateral o bilateral.
 - ◆ T3b Tumor que invade la/s vesícula/s seminal/es.
- T4 Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica.

N: Ganglios linfáticos regionales

- Nx No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
- N0 No se demuestran metástasis ganglionares regionales.
- N1 Metástasis en ganglios linfáticos regionales.

M: Metástasis a distancia

- Mx No se pueden evaluar las metástasis a distancia.
- M0 No hay metástasis a distancia.
- M1 Metástasis a distancia.
 - M1a Ganglios linfáticos no regionales.
 - M1b Hueso/s.
 - M1c Otras localizaciones.

1.5.3.2 Grado Histopatológico

El sistema propuesto por Gleason *et al* (1966) está reconocido internacionalmente, basado en un examen mediante biopsia, en el cual el resultado es un índice de anormalidad del

tejido, donde se adoptan valores entre 2 y 10. Con lo cual Gleason ayuda a establecer el pronóstico del paciente.

La clasificación es la siguiente:

GX No se puede evaluar el grado de diferenciación.

G1 Bien diferenciado (anaplasia débil): Gleason 2-4.

G2 Moderadamente diferenciado (anaplasia moderada): Gleason 5-6.

G3-4 Pobremente diferenciado/indiferenciado (marcada anaplasia): Gleason 7-10.

1.5.3.3 Estado clínico o histopatológico

Se clasifica mediante el grado de invasión local y metástasis del cáncer de próstata

TNM I o A: Cáncer descubierto incidentalmente, paciente con adenoma que se opera y en el informe del patólogo aparece el cáncer de próstata.

TNM II o B: Se detecta al tacto, mediante la palpación de un adenoma que además presenta pequeños nódulos duros en su interior. B1 o B2 depende del tamaño y de si se encuentra presente en los dos lóbulos de la próstata o no.

TNM III o C: Próstata que al tacto está dura y fija debido a la extensión del cáncer se más allá de la cápsula.

TNM IV: Cáncer con proceso de metástasis al hacer el diagnóstico

1.5.3.4 Riesgo

La TNM es insuficiente para establecer un tratamiento adecuado a pacientes con cáncer de próstata localizado. Los pacientes con este diagnóstico se pueden clasificar en subgrupos de riesgo o pronóstico en función de los factores de riesgo conocidos

Bajo riesgo: TNM I y Gleason < 7

Riesgo intermedio: TNM II o Gleason 7

Alto riesgo: TNM III y IV o Gleason >7

1.5.4 Signos y síntomas

Principalmente en las etapas iniciales del cáncer de próstata suele ser asintomáticos. Una vez avanzadas las etapas puede presentar:

- Problemas urinarios
 - i) Flujo de orina débil o interrumpido
 - ii) Ganas repentinas de orinar y aumento de la frecuencia
 - iii) Dificultad para iniciar el flujo de orina y para vaciar la vejiga por completo
 - iv) Dolor o ardor al orinar

- Problemas sexuales
 - i) Dificultad para tener una erección

- Presencia de sangre en la orina o el semen
- Dolor en la espalda, las caderas o la pelvis que no desaparece

Sin embargo, se debe consultar al médico ya que estos, pueden ser confundidos por enfermedades o afecciones distintas al cáncer.

1.5.5 Factores de riesgo en el cáncer prostático

1.5.5.1 Edad

El cáncer de próstata ocurre en muy pocas ocasiones en hombres menores de 40 años, pero la probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años. 6 de cada 10 casos de cáncer de próstata se detectan en hombres mayores de 65 años (Society, 2016).

1.5.5.2 Factores Genéticos

Existe la predisposición familiar al cáncer de próstata, e incrementa el riesgo cuando el padre y/o los hermanos se han visto afectados. Esta probabilidad aumenta cuando existe un número de integrantes familiares masculinos que fueron o están siendo afectados por la enfermedad (Moya, 2011).

Entre otras cuestiones genéticas que se pueden encontrar mutaciones genéticas en diversos genes los cuales puedes ayudar al desarrollo del cáncer de próstata.

1.5.5.3 Enfermedades de transmisión sexual

El antecedente de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), en casos de enfermos con cáncer de próstata es mayor en relación con casos controles. Se han encontrado partículas virales en el tejido prostático maligno como el Herpes Virus 2, Virus del Simio (SV 40) y Citomegalovirus (CMV) (Vilches, 2008).

1.5.5.4 Origen étnico

Los hombres de ascendencia africana presentan un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata que los hombres de ascendencia europea o asiática, aunque las razones no están claras.

1.5.5.5 Alimentación

No está claro si la alimentación y el estilo de vida intervienen en la aparición del cáncer de próstata. Algunos estudios indican que una alimentación rica en carnes rojas o productos lácteos aumenta ligeramente el riesgo de aparición de cáncer de próstata (European Society for Medical Oncology, 2014). Por otra parte, algunos estudios indican que una alimentación rica en licopenos (que se encuentran en el tomate) y selenio (un mineral que se encuentra principalmente en la carne roja, el pescado y los mariscos, los huevos y cereales) reduce ligeramente el riesgo de cáncer de próstata. La obesidad, por el contrario, aumenta el riesgo de aparición de cáncer de próstata (ESMO, 2016).

1.5.5.6 Hormonas

Los niveles elevados de la hormona testosterona aumentan el riesgo de padecer cáncer de próstata. La presencia de receptores esteroides en las células tumorales y la respuesta positiva a la supresión de los andrógenos, así como los altos niveles de dihidrotestosterona en las células cancerosas, apoyan la hipótesis hormonal (Fandos, 2015).

1.5.6 Diagnóstico

1.5.6.1 Tacto Rectal

El tacto rectal es un examen clínico para conocer el tamaño, la consistencia, la sensibilidad y los bordes de la próstata. El tacto rectal en sí mismo podría no detectar la mitad de los casos de cáncer de próstata, es conveniente realizar la combinación con un análisis de Antígeno Prostático Específico (PSA) (European Society for Medical Oncology, 2014).

1.5.6.2 Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son sustancias que a menudo pueden descubrirse en cantidades mayores que las normales en la sangre, orina, o tejidos del cuerpo de algunos pacientes con ciertos tipos de cáncer. Los marcadores tumorales son producidos por el propio tumor o por el cuerpo como respuesta a la presencia de cáncer o ciertas condiciones benignas (no cancerosas) (SSA S. d., 2001).

1.5.6.2.1 Antígeno Prostático Específico (PSA)

También llamado calicreína III, seminina o semenogelasa, el antígeno prostático específico es una glicoproteína con un peso de 34 kD, integrado por 237 aminoácidos, cuyo gen está activado en el cromosoma 19 del DNA de las células epiteliales de ductos y acinos prostáticos (Luis Carlos Sánchez-Martínez, 2013). El antígeno prostático específico total consta de dos fracciones: libre y compleja, susceptibles de ser cuantificadas en el suero de pacientes afectados por patologías tumorales de próstata, tanto benignas como malignas. Se considera que el nivel del antígeno prostático es alto cuando se encuentra por encima de los 4 ng/dL, con una sensibilidad que oscila entre 67.5 y 80 % y una especificidad de 60 a 80 % para el cáncer de próstata (Campbell-Walsh, 2010).

Al contar con nuevos métodos de detección precoz como el antígeno prostático específico y la ecografía transrectal, ha aumentado la tasa de detección de pequeños tumores localizados. Aunque por sí solos estos métodos no son concluyentes, asociándolos al tacto rectal son mucho más eficaces.

1.5.6.2.2 Fosfatasa Ácida Prostática (FAP)

La Fosfatasa Ácida Prostática (FAP) normalmente sólo se presenta en cantidades pequeñas en la sangre, pero puede encontrarse en niveles altos en algunos pacientes con cáncer de la próstata, sobre todo en metástasis. Sin embargo, los niveles de la FAP en la sangre también pueden elevarse en pacientes que tienen ciertas enfermedades benignas de la próstata o cuyo cáncer está en la fase temprana.

1.5.6.3 Biopsia

Constituye la prueba determinante en el diagnóstico del cáncer de próstata. Consiste en la obtención de muestras de tejido prostático con la ayuda de un ecógrafo transrectal. A la sonda de ecografía se le incorpora un dispositivo a través del cual se introduce una aguja larga y fina con la que vamos a realizar la punción y recolección de la muestra de tejido.

1.5.6.4 Ecografía transrectal

Un examen mediante ondas de sonido de alta frecuencia para crear imágenes de la capa del tejido de la superficie del recto. Una sonda se coloca en el recto a través de la abertura anal. Una pequeña cantidad de líquido se coloca en el extremo de la sonda para que la superficie de la sonda toque el interior del recto. Esto permite una mejor visualización del tejido. Es un procedimiento seguro indoloro que no contiene radiación.

1.5.7 Tratamiento

1.5.7.1 Cirugía

Se denomina prostatectomía radical a la intervención quirúrgica, la cual consiste en la extirpación total de la glándula prostática, entre las técnicas para realizar la prostatectomía radical se encuentran:

- Prostatectomía radical retropúbica
- Prostatectomía radical perineal
- Prostatectomía radical laparoscópica

Cabe destacar que la intervención solo es eficaz en la detección temprana del cáncer.

1.5.7.2 Radioterapia

La radioterapia emplea radiaciones ionizantes para el tratamiento local de determinados tumores, empleando rayos X con altas dosis de irradiación, rayos gamma, partículas alfa y beta o neutrones. Las radiaciones ionizantes poseen la capacidad de destruir las células tumorales en la zona donde son aplicadas. La radioterapia constituye un tratamiento eficaz para esta enfermedad. Sin embargo, esta al no ser específicas para las células tumorales suelen ser perjudiciales para las células sanas. Por ende, cada persona recibe una dosis de radiación, disminuyendo los efectos secundarios e individualizando la terapia (aecc, 2016).

1.5.7.3 Terapia hormonal (hormonoterapia)

Los tratamientos hormonales se utilizan, sobre todo, cuando la enfermedad está diseminada o bien como complemento de alguno de los tratamientos locales o en las recaídas que pueden presentarse tras dichos tratamientos. La eficacia del tratamiento hormonal se basa en suprimir la testosterona de la sangre.

Los andrógenos son necesarios para el crecimiento y función normal de la próstata, de igual forma son necesarios para que crezcan los cánceres prostáticos, promoviendo el crecimiento

al unirse al receptor de andrógenos y activarlos. En algunos tipos de cáncer prostático necesita concentraciones relativamente altas de andrógenos para crecer, es decir; son dependientes de los andrógenos. El tratamiento hormonal disminuye las concentraciones de andrógenos o bloquean la actividad de los andrógenos que pueden inhibir su crecimiento. Eventualmente se hacen resistentes al tratamiento, logrando que el cáncer que pueda desarrollar en bajas concentraciones de andrógenos.

1.5.7.4 Vacuna

En abril de 2010 la FDA aprobó PROVENGE® (Sipuleucel-T®; Dendreon®) una inmunoterapia celular autóloga, para el tratamiento de pacientes con cáncer asintomático o mínimamente sintomático metastásico de cáncer de próstata. Sipuleucel-T® es una vacuna terapéutica que se formula para estimular una respuesta inmune a las células de cáncer de próstata por la orientación de la fosfatasa ácida prostática (PAP), un antígeno de tejido expresado por células de cáncer de próstata. La intención terapéutica es generar células T contra la fosfatasa ácida prostática (PAP); célula T-PAP específicas capaces de reconocer y matar las células de cáncer de próstata que expresan PAP (Higano, 2011).

1.5.7.5 Braquiterapia

Es la opción para el tratamiento del cáncer de próstata localizado consiste en depósitos permanente de sustancias radiactivas selladas (semillas) en la próstata de bajas dosis (Nicholas G. Zaorsky, 2016). Así mismo existen semillas temporales colocadas mediante una sonda de ultrasonido transrectal en el área en una cavidad cerca de tumor, como la uretra o el recto; permitiendo aplicar dosis alta de radiación en un área más pequeña a comparación con la radioterapia (Randy V Hersek, 2007),

1.5.7.6 Quimioterapia

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos cuyo objetivo es impedir la división de las células cancerosas, así como inducir las a la muerte. Los fármacos administrados se eligen por medio del mecanismo de acción, tipo de cáncer, localización y resistencia, así como una terapia combinada por la sinergia entre estos que se pueda presentar. Así mismo, la quimioterapia antineoplásica está indicada en los pacientes con enfermedad metastásica y refractarios al bloqueo androgénico.

1.6 Fármacos antineoplásicos

Este trabajo se enfoca principalmente en el uso de quimioterapia para el tratamiento de este padecimiento. Evaluando nuevos compuestos que pueden ser usados como terapia antineoplásica.

El uso de fármacos en el tratamiento del cáncer se ha usado desde la década de 1940. Hay varias estrategias para tratar el cáncer; incluyendo cirugía, radioterapia, tratamiento inmunológico, y los enfoques basados en productos químicos.

La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con fármacos antineoplásicos citotóxicos y ahora es uno de los métodos más usados. Desafortunadamente, los fármacos antitumorales utilizados habitualmente en clínicas tienen una variedad de defectos, incluida la baja eficacia

del tratamiento elegido para el paciente (no funciona de igual manera para todos los pacientes), efectos secundarios debido a que también afecta a las células sanas y otros problemas como tratamiento de larga duración, administración intravenosa principalmente. Generalmente, los medicamentos contra el cáncer se dividen en tres categorías: citotóxico o quimioterapéutico, inmunoterapéutico, y medicamentos hormonales (Ruben Vardanyan, 2016).

1.6.1 Clasificación de los antineoplásicos

La clasificación que se utiliza actualmente se basa en la diana o punto de acción del antineoplásico (Juana Benedí, 2006):

- 1) Antineoplásicos que actúan sobre el DNA:
 - a) Agentes alquilantes (Carmutina y Lomustina)
 - b) Antibióticos (Antraciclinas y análogos)
 - c) Antimetabolitos (6-mercaptopurina; 6-tioguanina)
 - d) Derivados del platino (Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino)
 - e) Derivados de camptotecinas (Camptotecina-11)

- 2) Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis sin afectar al DNA:
 - a) Antineoplásicos de origen vegetal (vinblastina, vincristina, vinorelbina, etc)

- 3) Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular:
 - a) Antagonistas de estrógenos (Tamoxifen)
 - b) Antagonistas de andrógenos (Flutamida, Ciproterona)
 - c) Progestágenos (RU-486)
 - d) Interferones (interferon gamma)
 - e) Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH) [Leuprorelina]

- 4) Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario:
 - a) Factor de necrosis tumoral, interleucinas, anticuerpos monoclonales, vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG)

Los agentes quimioterapéuticos tradicionalmente suelen actuar contra todas las células que se dividen activamente. Un enfoque relativamente nuevo es apuntar sólo las células cancerosas; he interferir solamente con objetivos en las células tumorales que bloquean su crecimiento y proliferación. Este enfoque se denomina "terapias dirigidas" o "fármacos vectorizados" y hoy en día se generan nuevas clases de medicamentos contra el cáncer.

La diversidad de objetivos potenciales incluye una serie de nuevas posibilidades, algunas de las cuales son:

- a) Inductores de apoptosis
- b) Inhibidores de la angiogénesis que bloquean el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos alrededor de las células cancerosas

- c) Algunos medicamentos de inmunoterapia, representados principalmente por los anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas específicas en la superficie de las células cancerosas
- d) Inhibidores de la transducción de señales que bloquean los elementos de señalización que tienen papeles clave en la supervivencia y la proliferación de células cancerosas

1.6.2 Mecanismos de resistencia

Después del éxito inicial, el efecto puede desaparecer debido al desarrollo en el tumor de células resistentes. Existen diferentes mecanismos de resistencia, tales como (Heinz Lullmann, 2008):

- Disminución de la captación celular
- Incremento del transporte salida: Disminución de la bioactivación de un paso previo
- Modificación del sitio de acción
- Reparación del daño
- Inhibición de la apoptosis por activación de los mecanismos celulares antiapoptóticos

Con base en lo mencionado el siguiente tema presenta la base estructural que se ocupa para la síntesis de nuevas moléculas. Estas moléculas tienen un enfoque para uso antitumoral; por lo tanto, el modelado de nuevas entidades permite obtener diversos efectos que pueden ayudar al tratamiento de diversos tipos de cáncer.

1.7 Ácido Cinámico

Se ha utilizado al ácido cinámico (CA) como compuesto para la elaboración de moléculas nuevas que garanticen un efecto citotóxico ante diferentes tipos de cáncer. El ácido cinámico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos sencillos llamados fenilpropanoides por contener un anillo aromático y una cadena lateral de tres carbonos. Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de las mismas.

Entre la gran variedad de compuestos fenólicos, uno de los grupos importantes son los llamados ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos comprenden dos grupos: los ácidos benzoicos y los cinámicos.

El ácido cinámico y sus derivados han mostrado una variedad de propiedades farmacológicas. El ácido cinámico, un ácido graso de origen natural, aromático, presenta actividad antitumoral potencial sobre células de carcinoma de glioblastoma, melanoma, próstata y pulmón (Lei Liu, 1995).

1.7.1 Propiedades químicas

Sinónimos: ácido benzilidenacético, ácido cinámico, ácido 3-fenilacrilico, ácido 3-fenilpropenoico, ácido 2-propenoico, ácido 3-fenilo

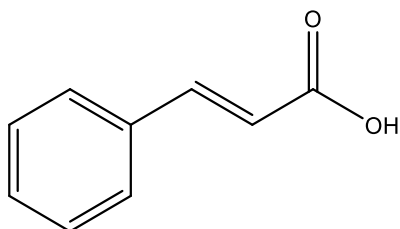
Formula: C₉H₈O₂

Peso Molecular: 148.16 g/mol

COE: ácido cinámico fue incluido por el Consejo de Europa en la lista de sustancias concedidas A, es decir; puede ser utilizada en productos alimenticios (COE, 2000)

FDA: ácido cinámico fue aprobado por la Administración de Alimentos y Drogas como un saborizante (FDA)

Estructura



1.7.2 Propiedades físicas

Es un polvo blanquecino cristalino y con un aroma floral

Punto de ebullición: 147°C

Punto de inflamación: 93.3°C

Punto de fusión: 134°C

Presión de vapor: <0.001 mmHg a 20°C

1.7.3 Propiedades farmacológicas

1.7.3.1 Absorción

la absorción vía oral comprende entre el 90-98% de absorción, la exposición o manipulación permite que un 7% de la dosis se absorbe a través de la piel ocluida y el 9% de la dosis se absorbe en la piel cuando ésta no fue ocluida.

1.7.3.2 Farmacocinética

El promedio de los niveles séricos de ácido cinámico en sujetos normales es variable, entre los 0.3 a 3.4mg/100ml; en pacientes con enfermedad hepatocelular, el nivel de ácido cinámico es elevado, de 4.2 a 13.8 mg/100ml (Saltzman, 1953).

1.7.3.3 Metabolismo

El ácido cinámico administrado por vía oral a seres humanos, es oxidado a ácido benzoico que se excreta por orina complejoado con glicina en forma de ácido hipúrico. Los metabolitos urinarios son el ácido glucurónico, ácido hipúrico y el ácido monocinamoilglucurónico. Análisis urinarios revelan que el 67-94% del ácido cinámico es metabolizado a ácido hipúrico (Saltzman, 1953). La excreción de ácido hipúrico indica que la oxidación del ácido cinámico al ácido benzoico se produjo rápidamente (Snapper, 1940).

1.7.4 Obtención

Se puede obtener del aceite de canela, de bálsamos como el storax, o de la manteca de karité; también puede obtenerse de manera sintética (Merino, 2013).

1.7.5 Biosíntesis del ácido cinámico

La ruta principal para la producción de estos compuestos a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, las plantas pueden desaminar la fenilalanina por medio de la enzima *fenilalanina amoniaco liasa* (PAL), mientras que la tirosina depende de la desaminación de tirosina por la *tirosina amoniaco liasa* (TAL). Aquellos organismos que no pueden desaminar la tirosina, obtienen el ácido *p*-cumárico por hidroxilación del ácido cinámico (Claramunt Vallespí, 2013). A continuación se muestra la reacción a partir de PAL o TAL para la obtención de ácido cinámico en la figura 2.

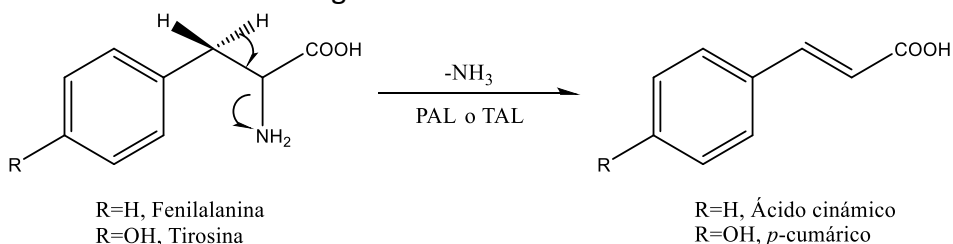


Figura 2. Síntesis de los ácidos cinámico y *p*-cumárico

1.7.6 Condensación de Knoevenagel, modificación de Döebner

La condensación de Knoevenagel se basa en reacciones de aldehídos y cetonas con compuestos que presentan metilenos activos en presencia de una base. La reacción produce compuestos α , β -insaturados (Lutz F. Tietze, 1991).

1.7.7 Reacción de Condensación de Knoevenagel, modificación de Döebner

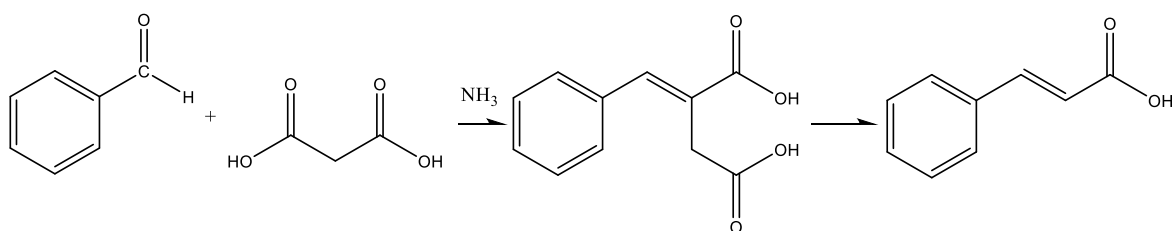


Figura 3. Reacción de obtención de ácido cinámico (Lutz F. Tietze, 1991)

1.7.8 Mecanismo de reacción

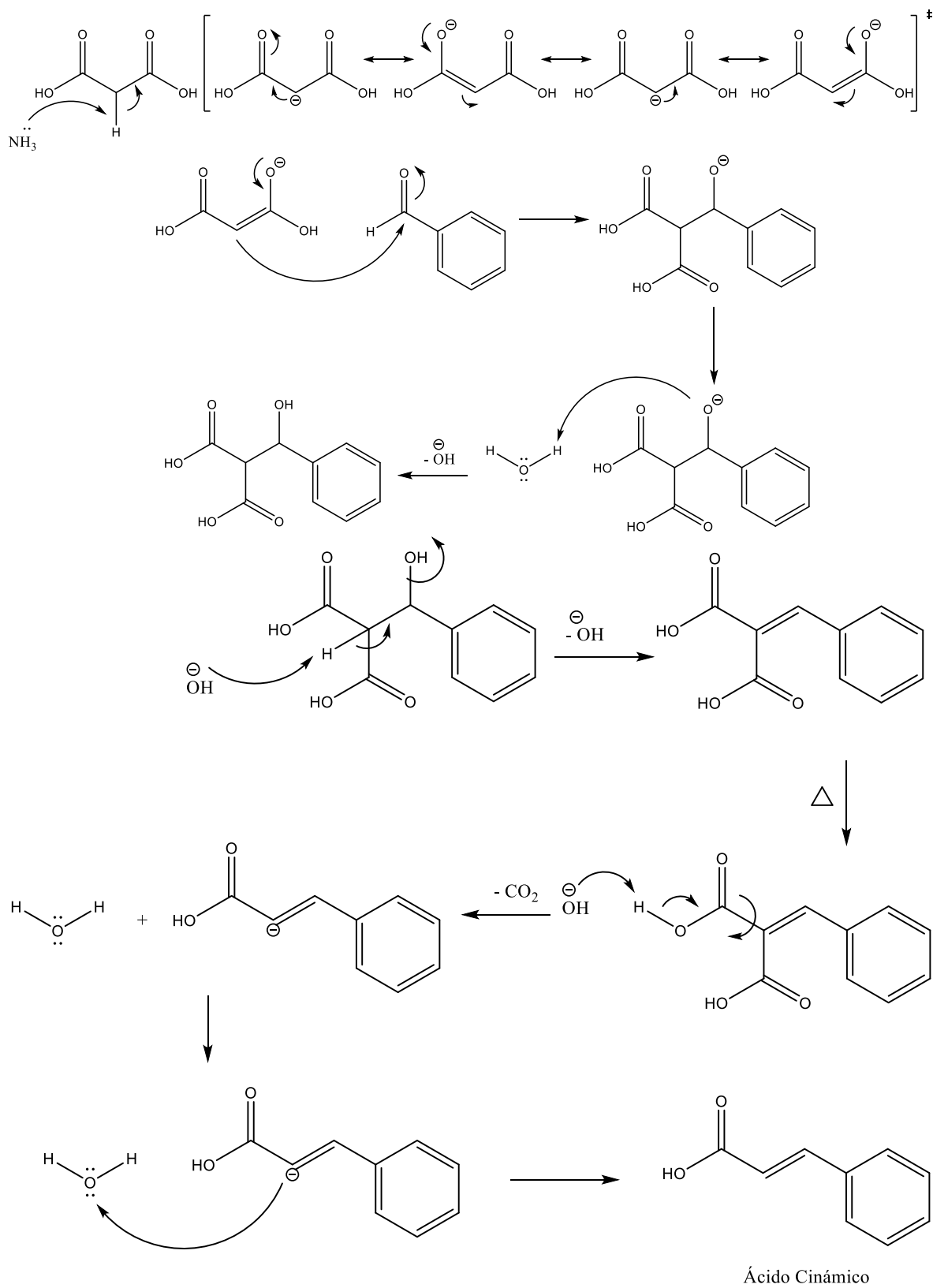


Figura 4. Mecanismo de reacción para ácido cinámico (Propuesta de mecanismo de reacción, Lenin García)

1.7.9 Usos

En la actualidad, el ácido cinámico tiene muchas aplicaciones, principalmente en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. El ácido cinámico es un componente ampliamente usado en shampoo, jabones de baño, así como en otros productos, como detergentes. Se utiliza para la fabricación de perfumes, sabores y productos farmacéuticos mediante sus ésteres, como el metil-, etil- y benzil-cinamato, entre otros (Figuroa, 2005). El ácido cinámico ha mostrado una variedad de propiedades farmacológicas que incluyen actividad hepatoprotector, antioxidante, y actividad antidiabética (Sirichai Adisakwattana, 2012).

Así mismo los derivados sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, necesitan de un vehículo para ser transportador y poder llegar a su sitio de acción por lo tanto en el siguiente tema se hablará acerca de un área importante en la medicina que proporciona conocimientos y tecnologías para permitir la entrega de estos compuestos.

1.8 Nanotecnología

El término “nanotecnología” se utilizó por primera vez por Norio Taniguchi en 1974. Inspirado por los conceptos de Feynman, K. Eric Drexler utiliza el término “nanotecnología” en su libro de 1986 “Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology”, que propuso la idea de una nanoescala, que sería capaz de construir una copia de sí mismo y de otros elementos de complejidad arbitraria con el control atómico. La nanotecnología comprende la ingeniería de sistemas funcionales a escala molecular (Kachapi, 2015). El prefijo *nano* en la palabra nanotecnología significa una mil millonésima parte de un metro (1×10^{-9}). La nanotecnología es la manipulación de la materia a escala atómica, molecular y supramolecular.

Una descripción más generalizada de la nanotecnología se estableció posteriormente por la Iniciativa Nacional de Nanotecnología, que define la nanotecnología como la manipulación de la materia con al menos una dimensión de tamaño de 1 a 1000 nm. En los últimos años la nanotecnología ha mostrado logros significativos en diversas disciplinas como la electrónica, fotónica, química de materiales y área médica (Jena, 2013).

1.8.1 Nanomedicina

La nanomedicina, un subconjunto de la nanotecnología, se define como la supervisión, reparación, construcción y control de los sistemas biológicos humanos a nivel molecular, utilizando nanodispositivos de ingeniería y nano estructuras (Reitas, 1999). En este último aspecto, el término nanomedicina involucra el empleo de sistemas nanoparticulados como eficientes herramientas para diagnóstico y tratamiento, de otra forma llamados nanoacarreadores o nanovehículos. Dentro de los nanoacarreadores empleados en terapéutica se encuentran los liposomas, las micelas, las nanopartículas metálicas, lipídicas y las poliméricas (Pájaro Castro, Olivero Verbel, & Redondo Padilla, 2013).

1.8.2 Nanopartículas

Una nanopartícula es un cuerpo que tiene una dimensión del orden de 100 nanómetros. Las nanopartículas terapéuticas fueron elaboradas por primera vez por Speiser y colaboradores durante la década de los 70's, pensando en desarrollarlas como medio de liberación de moléculas activas y vacunas (Kreuter, 2007). Actualmente sus aplicaciones terapéuticas son tan diversas como las vías por las cuales pueden ser administradas destacando dentro de ellas la vía oral, pulmonar, oftálmica, endovenosa, intramuscular, intraocular e intraarticular, entre otras (Viswanathan, 2010). Las nanopartículas son vehículos que se han venido empleando para el transporte y liberación controlada de fármacos (Hans ML, 2002).

Dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas destacan (De Jong, 2008):

- Mejorar la estabilidad física y química de los principios activos encapsulados.
- Aumentar la absorción de moléculas activas, mayor biodisponibilidad.
- Actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de principios activos en sangre.
- Alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro.
- Disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.
- Otorgar protección de la molécula encapsulada, contra la degradación enzimática, química o inmunológica.

El diseño de nanopartículas y sus interacciones con el medio ambiente definen su comportamiento. La composición de las nanopartículas depende de varios factores, se puede resumir que parte de sus principales características tendrán un efecto en términos de tamaño inicial, forma, carga, recubrimiento, potencial ζ , y el material. Se debe de tomar en cuenta muchos factores que están involucrados en su elaboración como se muestra en la figura 5.

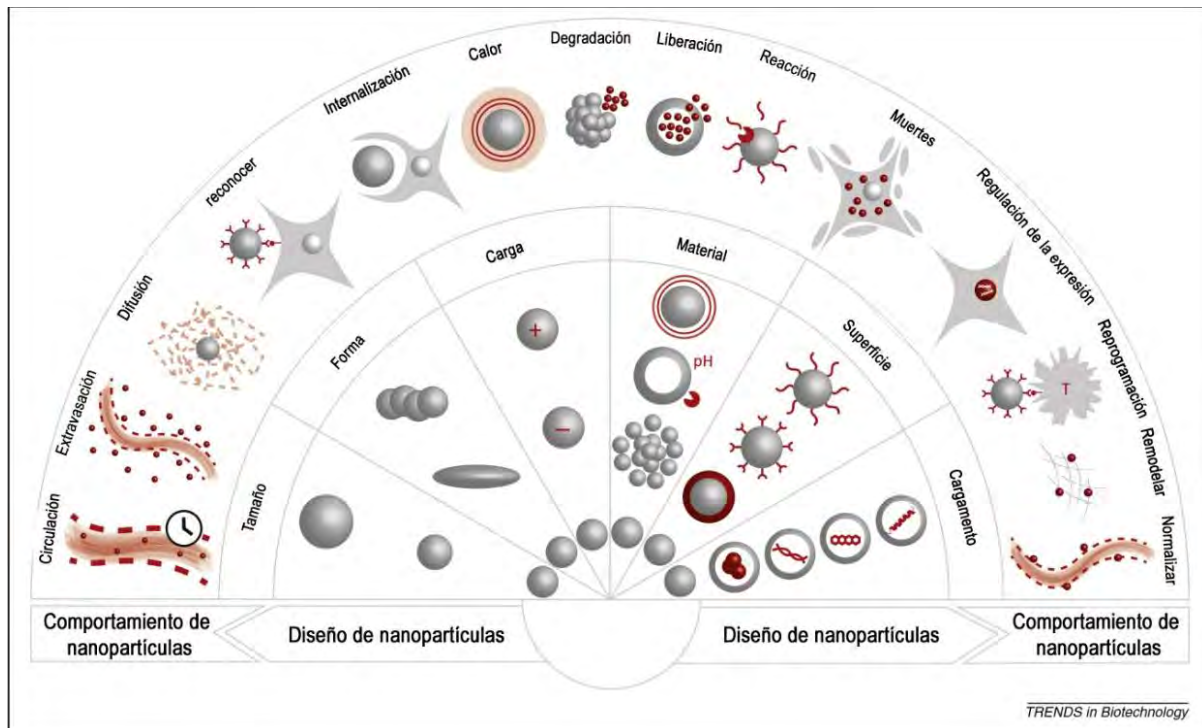


Figura 5. Comportamiento y diseño de nanopartículas en función a diversos componentes modificado (Bhatia, 2014)

1.8.3 Clasificación de materiales para nanopartículas

Estas se pueden clasificar en dos categorías: nanopartículas inorgánicas y nanopartículas orgánicas.

1.8.3.1 Nanopartículas inorgánicas

1.8.3.1.1 Puntos cuánticos (*quantum dots*)

Estas nanopartículas constan de cientos a miles de átomos de metal que forman un nanocrystal. Se caracteriza por una emisión de fluorescencia durante la excitación por una fuente de luz. La longitud de onda esta emisión de fluorescencia está directamente relacionada con el tamaño del punto cuántico siendo controlable durante la fabricación (Zeinerldin, 2015).

1.8.3.1.2 Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y supermagnéticas

Un tipo de nanopartículas de gran interés por sus potenciales aplicaciones en biomedicina son las de óxido de hierro, bien tengan el núcleo compuesto de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Estas nanopartículas se pueden utilizar como sistemas de liberación controlada, agentes de contraste de imagen en IRM (Imagen de Resonancia Magnética) (Laurent S, 2010).

1.8.3.1.3 Nanopartículas de diamante fotoluminiscentes

Los recubrimientos compuestos diamante comienzan a ser estudiados, debido a las excelentes propiedades físicas y químicas del diamante, tales como: alta dureza, bajo coeficiente de fricción y resistencia total al ataque de ácidos y bases (Calderón, 2010). La

adición de un (átomo de nitrógeno y/o níquel) durante la producción de un diamante sintético puede conducir a formación de centros fotoluminiscentes de color.

1.8.3.1.4 Sondas Raman

Formado a partir de un núcleo de metal (oro, plata o bismuto) que tiene propiedades físicas que permiten estudio espectroscópico en imágenes ópticas, y las cuales están cubiertas con una capa de sílice.

1.8.3.2 Nanopartículas orgánicas

1.8.3.2.1 Sistema Micelar (micelas) /liposomas

Una micela es un agregado de una monocapa de lípidos o fosfolípidos, que está compuesta por cabeza o porción polar que interactúa con el agua (hidrófila) y una zona no polar con cadenas de átomos de carbono o colas hidrofóbicas dirigiéndose al interior de esta. Los lípidos se reunirán en esferas que varía su tamaño dependiendo de la polaridad del disolvente. Las micelas se estabilizan mediante la adición de agentes tensoactivos o ciertas macromoléculas (lecitina, ovoalbúmina). Mientras que los liposomas son vesículas formadas por una doble capa, con una cavidad líquida en su interior. Las micelas y liposomas son lípidos que permiten el transporte de sustancias hidrófilas o hidrofóbicas.

1.8.3.2.2 Nanotubos de carbono

Están hechos ya sea por una sola pared de grafeno (nanotubos de pared única) o múltiples capas concéntricas (nanotubos de pared múltiple). Sólo presentan dos dimensiones a escala nanométrica, presentando propiedades físicas interesantes como una alta dureza y excelente conductividad.

1.8.3.2.3 Nanopartículas basadas en polímeros

El conjunto de nanopartículas de polímeros naturales (albúmina, heparina) o sintéticos como el ácido poliláctico-co-glicólico o polietilenglicol (PLGA, PEG) permiten el transporte de sustancias. Estas nanopartículas pueden estar recubiertas con moléculas que propician la selectividad a un tejido. Estas nanopartículas pueden controlar la liberación del principio activo.

1.8.4 Aplicaciones terapéuticas

Existe un amplio uso que se les puede dar a las nanopartículas que han sido de mucha ayuda para los avances de la medicina. Estos avances permiten tener tratamientos terapéuticos más específicos contra los diversos tipos de cáncer que existen en la actualidad. Por lo tanto, el uso de nanopartículas permite obtener una mayor eficacia y con menores efectos adversos, al proporcionar una terapia dirigida.

Algunas de las aplicaciones de los nanomateriales a la biología o la medicina:

- Marcadores fluorescentes biológicos
- Administración de fármacos y genes
- Detección de patógenos
- Detección de proteínas

- Sondeo de la estructura del DNA
- La ingeniería de tejidos
- La destrucción de tumores
- La separación y purificación de moléculas biológicas y células
- Mejora de contraste para IRM (Imagen por Resonancia Magnética)
- Estudios de fagocinética

1.8.5 Composición

Existen diversos materiales empleados como componente principal que forman nanopartículas de moléculas terapéuticas de las cuales se encuentran:

- Las grasas (fosfolípidos, ácidos grasos)
- Las proteínas (gelatina, albúmina)
- Y los polímeros, ya sea naturales (dextrano, quitosano), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos poli(acrilatos), poli(anhídridos), poli(acrilamidas) y poli(ésteres).

De estos últimos, el más utilizado para la elaboración de nanopartículas mediante el método emulsión evaporación de solvente es el copolímero sintético ácido poli (láctico co-glicólico) (PLGA) (Song, 2008). Entre las ventajas de este polímero se encuentra que es biodegradable y biocompatible. Presenta baja toxicidad comparada con otros polímeros y es muy apropiado como sistema de liberación en ambientes biológicos, aprobado por la FDA para su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos. Es importante considerar que la estructura química del polímero y su grado de entrecruzamiento (dado el caso) determinará el comportamiento de las nanopartículas en términos de encapsulación, degradación y liberación del fármaco.

1.8.6 PLGA

El PLGA es un poli(éster) formado por cadenas de ácido láctico y ácido glicólico, la proporción de cada co-polímero puede variar, lo cual modificará su degradación. En condiciones fisiológicas, el PLGA es hidrolizado en ácido láctico y glicólico respectivamente, a través del ciclo de Krebs que estos monómeros se metabolizan de forma endógena en los más simples subproductos como CO₂ y H₂O. (Vasir, 2007).

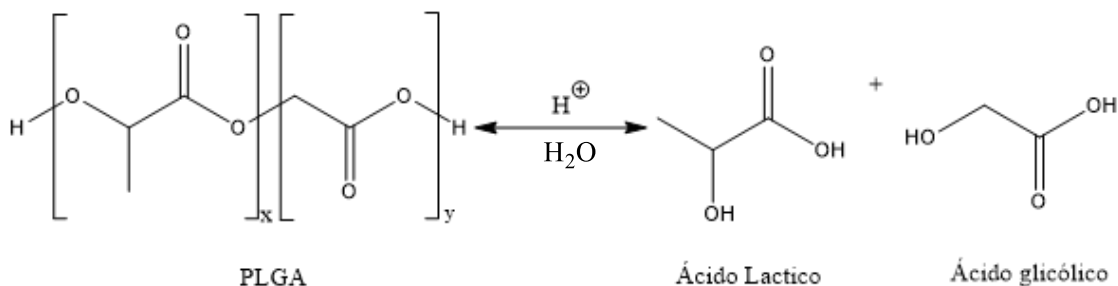


Figura 6. Hidrolisis de PLGA

Las diferentes formas de PLGA se pueden obtener mediante el uso de diferentes proporciones de ácido láctico y glicólico durante la reacción de polimerización, por ejemplo; PLGA 50:50, PLGA 75:25, PLGA 80:20, etc. Este fenómeno ha demostrado ser práctico para una liberación controlada de fármacos (Prokop, 2008).

Una gran variedad de fármacos puede ser administrados utilizando vectores nanoparticulados. Así, las nanopartículas se pueden emplear para la liberación de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Por lo tanto, las ventajas de este tipo de nanopartículas formuladas con poliésteres ofrecen una protección al principio activo en las condiciones biológicas y permiten una liberación sostenida, evitando así administraciones repetidas.

El vehículo específico de suministro de fármacos, es decir, PLGA, debe ser capaz de entregar su carga útil con la duración apropiada, la biodistribución y la concentración para el efecto terapéutico pretendido. Por lo tanto, esencial del diseño, incluido el material, la geometría y la ubicación debe incorporar mecanismos de degradación y eliminación del vehículo, así como ingredientes farmacéuticos activos (API).

Gracias a sus características permite que una mayor cantidad de moléculas llegue al sitio de acción, siendo más específico y disminuyendo la toxicidad que puede ocasionar la molécula a las células sanas, concentrando más compuestos en el sitio de acción; disminuyendo así los efectos secundarios que se pueden presentar. De igual manera causan un impacto en la escala que estos se encuentran, ya que manejando tamaños nanométricos permiten una mejor absorción por parte de las células.

1.8.6.1 Métodos de Elaboración de nanopartículas de PLGA

Existen numerosos métodos para elaborar nanopartículas poliméricas que permitan la encapsulación de moléculas hidrófobas o hidrófilas, simples o complejas. Estos métodos se clasifican en dos; los de elaboración directa y aquellos a base de polímeros preformados. Dependiendo del proceso de preparación, la organización estructural de la nanopartícula puede variar (F. Rocha Formiga, 2009).

1.8.6.1.1 Emulsión Evaporación

Dentro de los métodos que emplean polímeros preformados destacan la emulsión- evaporación de solvente (simple o doble) que permite obtener nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente.

Es un método bien establecido basado en el procedimiento clásico patentado por *Vanderhoff et al.* para la preparación de pseudo-latex o látex artificiales. El polímero preformado y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico inmiscible en agua, que se emulsiona en una solución acuosa. Esta emulsión cruda se expone entonces a una fuente de alta energía tal como los dispositivos ultrasónicos o se pasa a través de homogeneizadores. La eliminación posterior del disolvente orgánico, por el calor, vacío, o ambas, da como resultado la formación de una dispersión acuosa fina de nanoesferas. (Quintanar-Guerrero & Eric Allemann, 1998).

En la doble emulsión- evaporación de solvente, la eficiencia de encapsulación y tamaño de las partículas son predominantemente afectados por el tipo de flujo de disolvente y grado de agitación. Una cantidad apropiada de fármaco se disuelve en una fase acuosa, seguido de la adición simultánea de solución de fármaco en una fase orgánica agitándose constantemente. Esto da como resultado la formación de una emulsión primaria agua/aceite. Además, la emulsificación se logra mediante la adición de la emulsión primaria en una solución acuosa, seguido de agitación simultánea y, posteriormente, permitiendo que el disolvente orgánico se evapore para obtener las nanopartículas.

1.8.6.1.2 Separación de fases (Coacervación)

Este proceso conduce principalmente a la formación de nanopartículas poliméricas de tamaño nanométrico a través de la separación de fases líquido-líquido. En este método, se forman dos fases líquidas que comprenden la fase de coacervado y la fase sobrenadante con polímero. El proceso de coacervación incluye tres pasos principales

1. La separación de fases de la solución de polímero de recubrimiento
2. La adsorción de la coacervado alrededor de las partículas de fármaco
3. El enfriamiento de las microesferas

Polímeros y disolvente se mezclan en una relación apropiada, seguido de la adición del fármaco; es decir, fármaco hidrófilo en emulsión. Sin embargo, la morfología y el tamaño de las microesferas se pueden controlar mediante la alteración de los siguientes parámetros del proceso tales como:

- a. Concentración de polímero
- b. Composición del disolvente
- c. Velocidad de agitación

1.8.6.1.3 Emulsión-difusión

Esta técnica es la modificación del método de salting out. Un equilibrio termodinámico inicial se logra saturando mutuamente el disolvente y el agua a temperatura ambiente antes de su uso. La emulsificación de la fase orgánica que contiene el polímero y el fármaco en solución acuosa de tensoactivo se consigue mediante homogeneización a alta velocidad. Con el fin de alcanzar una reacción de transformación de fase y la difusión hacia el exterior del disolvente de la fase interna, se añade agua con agitación regular. Las nanopartículas coloidales se forman como resultado de nanoprecipitación.

1.8.6.1.4 Emulsificación inversa

La fase orgánica que contiene el polímero y el fármaco se añade en primer lugar a un disolvente miscible en agua. Una emulsión aceite/agua se forma por la fuerza de agitar magnéticamente el disolvente orgánico preformado con una solución acuosa que contiene

el agente de precipitación salina y un estabilizador coloidal. La difusión de disolvente orgánico volátil en la fase acuosa se inicia como consecuencia de la cual se forman las nanopartículas.

1.8.6.1.5 Nanoprecipitación

Es un proceso de un solo paso, por lo general usado para atrapar fármacos hidrófobos en la matriz polimérica. La fase orgánica se forma disolviendo polímero y fármaco en un disolvente polar. Esta solución se añade a una solución acuosa que contiene emulsionante o tensoactivo. La rápida difusión de disolvente resulta en la formación de las nanopartículas.

1.8.6.1.6 Diálisis

La diálisis se emplea generalmente para la preparación de nanopartículas de tamaño pequeño que tienen una distribución estrecha. El polímero se disuelve en un disolvente orgánico volátil y se coloca dentro de una bolsa de diálisis de tamaño de poro adecuado. La bolsa de diálisis permite el desplazamiento de disolvente fuera del medio, perdiendo de igual forma la solubilidad, concentrando las nanopartículas, en última instancia conduce a la agregación progresiva de polímero y formación de la suspensión homogénea de nanopartículas.

1.8.7 Internalización celular

Existen varios mecanismos de internalización celular de las nanopartículas, que son influenciados por las propiedades fisicoquímicas de las estas mismas. Los cuales son la fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas y macropinocitosis (Hillaireau, 2009). La actividad farmacológica de la molécula encapsulada dependerá de la forma en que penetra a la célula, además del ambiente celular en el cual se encuentre, en los que se pueden encontrar en el citoplasma de la célula o llegar directamente a lisosomas. Tanto el pH ácido como el contenido enzimático son claves para que las nanopartículas poliméricas se degraden y no generen toxicidad, las nanopartículas de PLGA, se degradan por mecanismos hidrolíticos facilitados por el pH ácido y presencia de esterasas (Shive, 1997). A continuación se muestra una representación esquemática de la internalización de las nanopartículas en la célula presente en la figura 7.

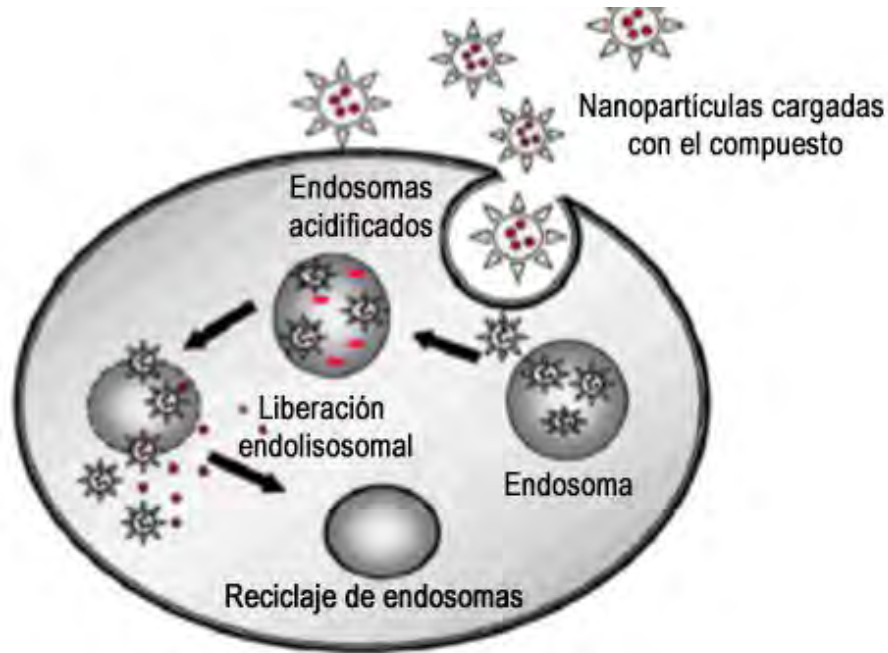


Figura 7. Representación esquemática de la internalización de nanopartículas en la célula modificado (Bhatia, 2014)

1.8.7.1 Endocitosis

El proceso por el cual la célula introduce moléculas o partículas por medio de la membrana plasmática y las cuales son incorporadas al interior de la célula mediante la formación de una vesícula intracelular de la membrana. En general, las vías endocíticas se pueden dividir en dos amplias categorías, la fagocitosis y pinocitosis (William J, 2013). Se presenta en la figura 8 un modelo que señala los mecanismos de transporte intracelular de nanopartículas.

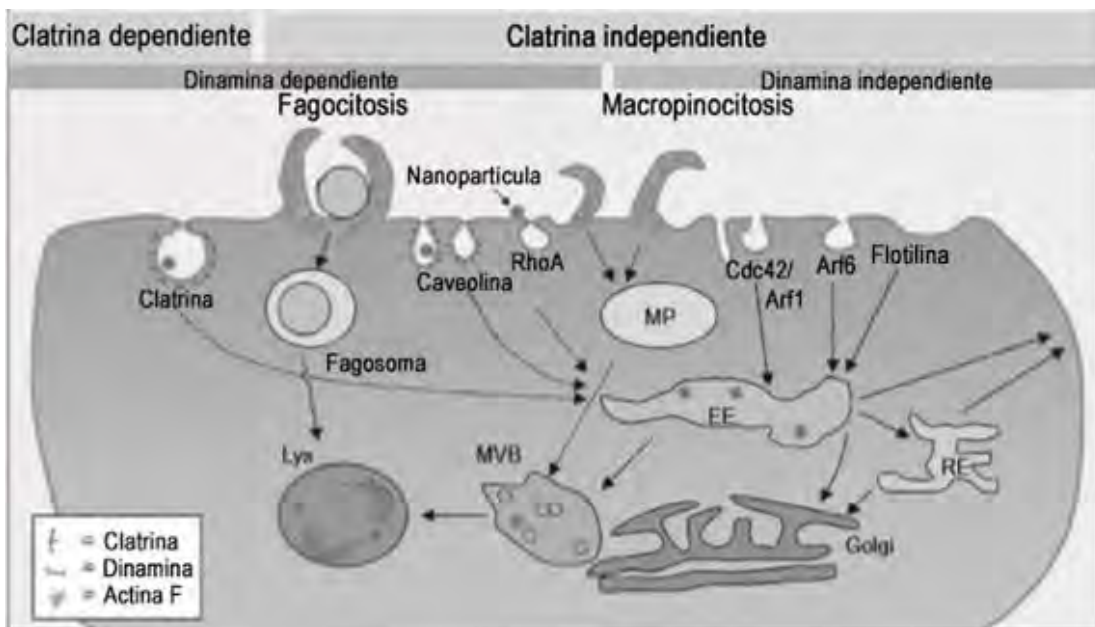


Figura 8. Modelo del mecanismo de endocitosis y transportación intracelular de las nanopartículas modificado (Wang Z, 2009)

1.8.7.2 Fagocitosis

La fagocitosis es una adaptación antigua. En los organismos primitivos se utiliza principalmente para la adquisición de nutrientes, mientras que, en los organismos superiores, se produce en células especializadas y se requiere para una amplia variedad de eventos biológicos especializados. Es la primera etapa en la activación de la defensa del huésped y la inflamación, se requiere para la eliminación de las enormes cantidades de células senescentes que mueren cada día. En la fagocitosis, el macrófago ingiere nanopartículas de gran tamaño (0,25 a 3,00 μm) y de superficie hidrófoba, que han sido previamente reconocidas como cuerpo extraño y son opsonizadas. Las nanopartículas cargadas (ya sea positiva o negativamente) son más fagocitadas que las partículas neutras (Roser, 1998).

1.8.7.3 Endocitosis mediada por clatrina

Se produce a través de la invaginación de membrana y vesículas recubiertas de clatrina/AP2 por un proceso similar al empaquetamiento de enzimas lisosómicas por manosa 6-fosfato. Las nanopartículas internalizadas son aquellas que poseen en su superficie ligandos específicos, comúnmente usados; la transferrina, riboflavina y la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Bareford, 2007). Una vez unida la nanopartícula al receptor, se genera la invaginación de la vesícula, la cual tiene un diámetro cercano a los 120 nm hasta 200 nm (Rejman, 2004). Esta vesícula entrega su contenido a los endosomas, los cuales se acidifican por la bomba de protones dependiente de ATP. Los endosomas, se fusionan con las vesículas lisosomales generando un ambiente hostil que degrada la carga interna (Mukherjee, 1997).

1.8.7.4 Endocitosis mediada por caveolas

Las caveolas son regiones de membrana con balsas lipídicas, receptores proteicos de membrana y una familia de proteínas de membrana singulares denominadas caveolinas. Los receptores presentes en las caveolas son proteínas ancladas a lípidos. Se describieron en los años 50 del siglo XX por P. Palade gracias a imágenes de microscopía electrónica. Son unas pequeñas invaginaciones en la membrana plasmática (50-80 nm) presentes en la mayoría de las células eucariotas que posteriormente se transforman en vesículas. Una vez internalizadas, las vesículas caveolares, que mantienen su estructura tras la endocitosis, pueden dirigirse a unos orgánulos llamados caveosomas, unas estructuras citoplasmáticas preexistentes que tiene pH neutro, las nanopartículas endocitadas se dirigen al retículo endoplásmico o al complejo de Golgi, sin el contacto en el transporte con enzimas que degraden a las nanopartículas (Muñoz, 2007).

1.8.7.5 Pinocitosis

Pinocitosis es la internalización de líquido exterior y solutos. Hay dos tipos de pinocitosis: el primer tipo (macropinocitosis) envuelve macromoléculas que varían de 0.2 a 10 μm de diámetro y el segundo (micropinocitosis) envuelve macromoléculas y partículas de menos de 0,2 μm de diámetro (William J, 2013).

1.8.7.6 Macropinocitosis

Es un proceso mediante el cual se incorporan grandes cantidades de fluido extracelular. En la superficie celular se crean evaginaciones formando una gran vesícula interna o macropinosoma. El mecanismo de formación de los macropinosomas involucra a los mismos componentes que actúan durante la fagocitosis: los filamentos de actina y las proteínas motoras miosina, con un tamaño del orden de los micrómetros (1-5 μm) (J.A. Swanson, 2016). El destino intracelular varía dependiendo del tipo de célula, pero en la mayoría de los casos los macropinosomas se acidifican y destruyen. Eventualmente pueden fusionarse con los lisosomas (Hillaireau, 2009).

1.8.8 Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de PLGA

1.8.8.1 Vacunas

Numerosos antígenos como proteínas, péptidos, lipopéptidos, lisados de células, virus o DNA plásmido se han formulado con éxito en nanopartículas de PLGA. En la vacunación, las liberaciones prolongadas de antígenos pueden proporcionar respuestas inmunes más eficaces. También se puede evitar el riesgo de la tolerancia y sustituir la necesidad de varias administraciones típicamente requeridas para inducir inmunidad protectora.

1.8.8.2 Inflamación

Con el fin de evitar efectos secundarios graves resultantes de la aplicación sistémica y tratamiento a largo plazo, un suministro local de fármacos antiinflamatorios podría ser un enfoque interesante, presentes en nanopartículas de PLGA mostraron ser capaces de mejorar la localización de fármacos en sitio de destino y de liberar de forma controlada el compuesto cargado.

1.8.8.3 Cáncer

Los agentes quimioterapéuticos dañan los tejidos sanos, lo que lleva a toxicidad sistémica y los efectos adversos que limitan en gran medida la dosis máxima tolerada de fármacos contra el cáncer y por lo tanto restringe su eficacia terapéutica. Para resolver estos problemas, los nanomedicamentos han atraído gran atención en los últimos años. Nanopartículas a base de PLGA se encuentran actualmente bajo investigación para aplicaciones en formación de imágenes de cáncer y la terapia contra el cáncer (Fabienne Danhier, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a los efectos secundarios que presentan los diversos tratamientos contra el cáncer de próstata, se realizan investigaciones de nuevos fármacos potenciales para el tratamiento y que al mismo tiempo sea molecularmente específicos para el tipo de cáncer que se desea tratar, disminuyendo la toxicidad a las células sanas. El cáncer de próstata es el principal cáncer que afecta al género masculino y para el cual existen pocos tratamientos para combatirlo, es por ello necesaria la síntesis de nuevas moléculas con potencial para el tratamiento eficaz contra las células cancerígenas, y con menor daño a las células sanas disminuyendo los efectos secundarios que suelen presentarse. Por lo tanto, en diversos estudios que se han realizado en el laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se ha demostrado que derivados del ácido cinámico tienen un efecto antitumoral, y por lo cual es necesario realizar el estudio de estas moléculas análogas y/o derivados del ácido cinámico para conocer el efecto inhibitor del crecimiento en las células neoplásicas y la baja toxicidad que presentan en las células sanas. Uno de los principales problemas que se tiene en los cultivos celulares es no poder evaluar sustancias hidrófobas o insolubles en agua o diversas soluciones buffer a pH próximo al neutro, por lo cual la encapsulación de los compuestos en nanopartículas permite ser una opción confiable para la resolución de este problema. La encapsulación de compuestos anteriormente probados en nanopartículas permite mejorar su solubilidad y biodisponibilidad para comprobar la efectividad de los mismos en la línea celular de cáncer de próstata, y de los cuales no se han realizado estudios previos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica de nanopartículas biodegradables de PLGA como vehículo de administración cargados con los compuestos LQM serie 700 en línea celular de cáncer de próstata y queratinocitos sanos.

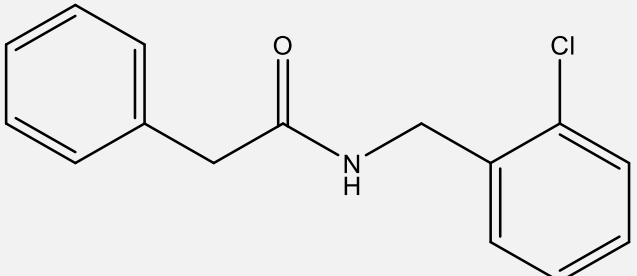
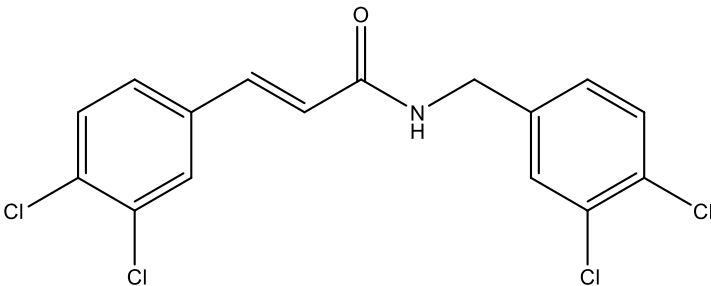
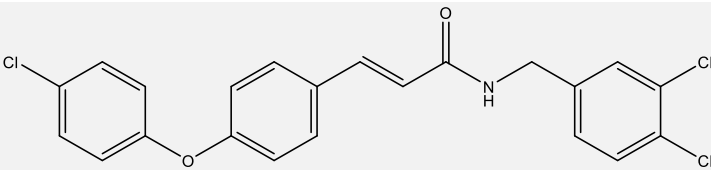
3.2 Objetivos específicos

1. Elaborar un diseño experimental multivariable por medio de un software estadístico para analizar qué sistema es el óptimo para la elaboración de las nanopartículas con los compuestos LQM 717,731,738 y 755.
2. Caracterizar las nanopartículas biodegradables de PLGA con los compuestos LQM por carga del compuesto, tamaño de partícula y potencial zeta.
3. Evaluar la viabilidad como marcador de actividad citotóxica de las nanopartículas con cada uno de los 4 compuestos en línea celular de cáncer de próstata.
4. Evaluar la viabilidad como marcador de actividad citotóxica de las nanopartículas con cada uno de los 4 compuestos en línea celular HaCaT (queratinocitos sanos).
5. Determinar la IC_{50} de las nanopartículas cargadas para determinar su efectividad.

4. METODOLOGÍA

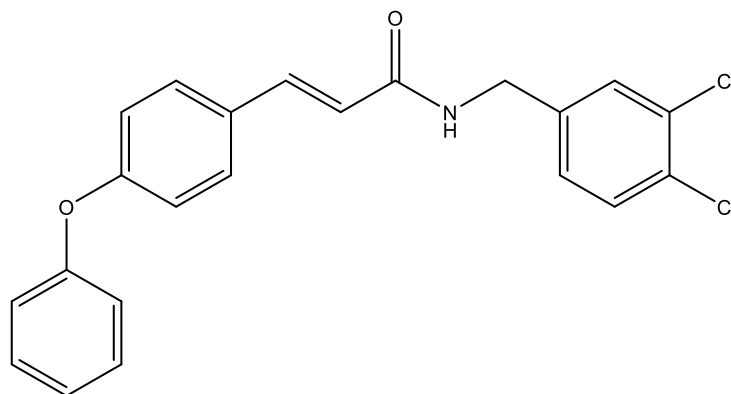
Se utilizaron los siguientes reactivos para la preparación de los sistemas de nanopartículas: PLGA 50:50 (láctico-co-glicólico) terminado en ácido Sigma-Aldrich **808482**, Alcohol polivinílico (PVA) Sigma-Aldrich **341584**, glicerol, acetona y LQM 717, 731, 738 y 755 proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, quienes realizaron su síntesis y caracterización química presentes en la Tabla 4 (Martinez Soriano, y otros, 2015).

Tabla 4. Estructuras de los compuestos

Clave	Estructura	Peso molecular
LQM 717	 <p>N-2-clorobencil 2-fenil acetamida</p>	251.32 g/mol
LQM 731	 <p>N-(3,4-diclorobencil)-3-(3,4-diclorofenil)-2-propenamida</p>	375.07 g/mol
LQM 738	 <p>N-3,4-diclorobencil-4-(4-clorofenoxi)-2-propenamida</p>	432.72 g/mol

LQM 755

398.28 g/mol



N-3,4-diclorobencil-3-(4-fenoxi)-2propenamida

4.1 Preparación y elaboración de los sistemas de nanopartículas

Se propuso para la fabricación de los sistemas nanoparticulados un diseño experimental $2^2 \times 3^1$ con dos réplicas, para un total de 24 corridas experimentales, se utilizó para la construcción y la aleatorización de las corridas el software Statgraphics centurión XV. Las variables independientes fueron la concentración de PLGA, la concentración de PVA y la concentración de LQM, las dos primeras a dos niveles y la tercera a tres niveles, presentes en la Tabla 5.

Tabla 5. Variables independientes para determinación experimental

<i>Variables</i>	<i>Niveles</i>		
<i>Concentración de LQM</i>	50 μ M	75 μ M	100 μ M
<i>PVA</i>	1 %	3 %	
<i>Cantidad de PLGA</i>	50 mg	75 mg	100 mg

Para cada uno de los sistemas, se necesitó la preparación de las soluciones de PVA al 1% y 3% w/v. Se realizaron los cálculos necesarios para pesar la cantidad de LQM que se desea cargar en las nanopartículas, siendo la carga de 25 y 50 μ M. Finalmente se pesaron las cantidades respectivas de PGLA 50, 75 y 100 mg.

La elaboración de cada uno de los sistemas se llevó a cabo por el método de emulsión/evaporación en el cual el PLGA se puede utilizar para encapsular fármacos hidrófobos e hidrófilos en forma de micro o nanopartículas. Se prepararon las soluciones A (1% PVA o 3% PVA en 20ml de agua) y solución B (LQM 25 o 50 μ M disueltos en 10 ml acetona y PLGA 50, 75 o 100mg). Una vez preparadas las soluciones para cada sistema, se añade la solución B a la solución A; obteniéndose una solución B/A, se dejó mezclando durante 10 min a 100 rpm en equipo Homogenizer Glas-Col. Repitiéndose con cada uno de los sistemas a determinar.

Una vez obtenidos todos los sistemas se llevaron al rotavapor BUCHI SWITZERLAND R-210, separando así la acetona del sistema mediante la evaporación a presión reducida. Las

condiciones utilizadas para la evaporación de disolvente orgánico fueron: $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100 rpm. Se almacenan los sistemas de nanopartículas obtenidos en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Obtención de las nanopartículas

Cada uno de los sistemas se llevó a ultracentrifugación colocándose primeramente en tubos para ultracentrífuga de polietileno, añadiendo 5 ml de glicerol y posteriormente colocando el sistema a procesar. Este proceso se llevó a cabo en ultracentrífuga Beckman Coulter Optima™ XL-100K a 20,000 rpm/1 hr / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Terminado el proceso que obtendrán 3 fases diferentes: la de mayor densidad proporcionada por el glicerol, para facilitar la recuperación de las nanopartículas, la fase intermedia de nanopartículas y el sobrenadante.

4.3 Recuperación de nanopartículas

Se recuperaron tanto el sobrenadante como las nanopartículas en tubos Falcon de 15 ml. Una vez recuperadas las nanopartículas el sistema se afora a 10 ml con agua bidestilada para evitar la aglomeración de estas. Se almacenan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 Purificación de nanopartículas

Una vez obtenidas las nanopartículas, se procede a la purificación de estas por medio de filtro Millipore $0.45\text{ }\mu\text{M}$ colocándolas en tubos Falcon estériles mediante el uso de campana de flujo laminar, en un ambiente estéril.

4.5 Determinación de carga de LQM

Para la determinación de la carga de LQM en las nanopartículas de PGLA se utilizó el sobrenadante obtenido de la ultracentrifugación, el cual contenía el LQM restante no encapsulado en las nanopartículas, determinándose mediante espectrofotometría UV/Vis usando un Espectrofotómetro CARY 100 Conc. Se construyó una curva de calibración, usando una mezcla acetona: agua (66:34) para solubilizar los compuestos, utilizando una proporción igual para la solución blanco. Las muestras se prepararon primeramente homogeneizando el sobrenadante obtenido y tomando 1 ml de muestra, la cual se resuspendió en 2 ml de acetona, homogeneizando la muestra.

4.6 Determinación de tamaño de nanopartículas

La determinación se realizó a 25°C por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica o espectroscopia de correlación de fotones en un equipo Zetasizer Nano – ZS90 Modelo: ZEN3690. Se diluyó la muestra con agua bidestilada, tomando $150\text{ }\mu\text{L}$ de la muestra de nanopartículas y se adicionan $1000\text{ }\mu\text{L}$ de agua. Se colocó la muestra en el equipo, obteniendo lecturas por triplicado. Una vez finalizada la lectura de la muestra se desechó la muestra y se lavó la celda de cuarzo con agua bidestilada.

4.7 Determinación de Potencial Z

La determinación del potencial Zeta se lleva a cabo en un equipo Zetasizer Nano- ZS90 Modelo: ZEN3690 bajo las mismas condiciones que la determinación de tamaño de partícula teniendo cuidado de que la solución no presente burbujas al momento de la lectura.

4.8 Pruebas Biológicas

4.9 Almacenamiento y congelamiento

Las líneas celulares se congelan con 1 ml suero fetal bovino y DMSO estéril (dimetil Sulfóxido) al 10% a -70°C almacenándose en nitrógeno líquido. El proceso de descongelación se realizó a temperatura ambiente, la recuperación de las células se realizó mediante centrifugación a 800 rpm por 5 minutos, posteriormente se decantó el suero fetal bovino con el DMSO y las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo DMEM/F-12 Gibco™ suplementado con antibiótico-antimicótico (anti-anti).

4.10 Cultivo celular

Las células de cáncer de próstata (PC-3) y queratinocitos (HaCaT) fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cancerología. Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 Gibco™, suplementado con 10 % (v/v) Suero Fetal Bovino (FBS) y 1% antibiótico-antimicótico Gibco™ a 37°C, en atmosfera de humedad 95% y 5% CO₂, en botellas 25 mm² Thermo Fisher Scientific. La presencia de un viraje por parte del indicador Rojo de Fenol, indica que las células se han adherido, permitiendo que estas comiencen a replicarse y empiecen a requerir los sustratos del medio produciendo productos ácidos, lo que lleva a realizar un cambio de medio decantándolo en un contenedor con hipoclorito de sodio al 1% y agregando medio fresco permitiendo al cultivo alcanzar una confluencia del 90 % o superior.

4.11 Pase Celular

Una vez que el cultivo alcanzó la confluencia adecuada (≈90%), las células se retiran del proceso de incubación. Para despegar las células se prepara una solución de tripsina, colocando 100µl de tripsina al 2.5% en una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y buffer fosfato salino (PBS), la cual se preparó colocando 6ml de EDTA al 0.5M en 300 ml de PBS. Una vez preparada la solución decantar el medio de la botella y lavar con 3ml de solución PBS. Posteriormente colocar 3 ml de solución de tripsina a las botellas, incubar a 37 °C/5% CO₂/ 5min. Observar al microscopio para corroborar que todas las células se han desprendido; hecho esto las células se traspasan a tubos Falcon de 15ml, se centrifugan a 1200 rpm/5 min/4°C, y se decanta el sobrenadante. Resuspender las células en una alícuota, la cual depende del número aproximado de células presentes con medio DMEM/F-12. Transferir 1 ml a botellas de 25mm² o 2 ml a 75mm².

4.12 Actividad citotóxica *in vitro* de los compuestos

Todos los compuestos presentes en la Tabla 4, se evaluaron *in vitro* para su citotoxicidad en línea celular de cáncer de próstata (PC-3) y línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT), mediante el uso de la técnica de exclusión azul tripano, utilizando 2 controles, células sin tratamiento (control) y nanopartículas sin carga (control nanopartículas).

4.13 Siembra

Se sembraron un total de 80,000 células de cada línea celular por pozo sembrándose en cajas de 6 pozos con 2 ml de medio DMEM/F-12 suplementado con 10 % de SFB y 1 % anti-anti. Se incuban a 37 °C/ 5% CO₂/ 95% durante 24horas para la adhesión de las mismas.

4.14 Exposición

El medio es retirado por aspiración, lo cual también elimina las células no adheridas. Se adiciona cada una de las concentraciones a evaluar (12.5, 18.75, 25, 50 y 100 μ M) disueltas en medio DMEM/F-12 suplementado. Una vez adicionadas todas las concentraciones, llevar a incubación a 37 °C/5% CO₂/95% de humedad durante 24 horas.

4.15 Técnica de exclusión de azul tripano

Una vez finalizado el tratamiento se procede al conteo de viabilidad celular. La prueba de exclusión del colorante se utiliza para determinar el número de células viables presentes en la alícuota. Su principio se fundamenta en la exclusión de ciertos colorantes que las células vivas por medio de su membrana celular evitan su captación, como el azul de tripano, mientras que las células muertas no lo hacen. Los cálculos del porcentaje de células viables se obtienen mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Número total de células viables por ml de alícuota}}{\text{Número total de células por ml de alícuota}} \times 100\%$$

Para la determinación del número total de células viables o conteo celular, se utilizó el equipo Automated Cell Counter (Biorad), el cual proporciona el número de células totales por ml, total de células vivas por ml y % de viabilidad celular.

Se retira el medio con el tratamiento evaluado por aspiración, desprendiendo posteriormente a las células mediante 1 ml de tripsina, incubar 37 °C/5%/5 min para que actúe la enzima, una vez despegadas todas las células recuperar en tubos eppendorf, lavando los pozos con 1 ml de PBS. Una vez recuperadas todas las células centrifugar los tubos eppendorf a 1200 rpm/ 5 min. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml PBS. Las células suspendidas se homogenizan cuidadosamente, posteriormente se toman 20 μ L de la suspensión y se mezclan con 20 μ L de solución azul tripano 0.4% (Sigma-Aldrich®) (1:1) colocando la preparación en una placa de doble cámara de lectura #1450003, llenando esta por capilaridad e inmediatamente leer en el equipo Automated Cell Counter (Biorad).

Los resultados fueron expresados como % de viabilidad celular, mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{número de células tratadas}}{\text{número de células control}} \times 100\%$$

La curva se construye teniendo en cuenta las concentraciones utilizadas y el porcentaje de reducción del crecimiento celular correspondiente. Se realizó 2 estudios por triplicado.

4.16 Optimización de las nanopartículas

El análisis de las características de las nanopartículas se realizó por medio de análisis multivariable optimizando las condiciones de elaboración de las nanopartículas, así mismo obteniendo la determinación estadística de los sistemas elaborados.

4.17 Determinación de IC₅₀

Para la determinación de IC₅₀ se realizó en software SigmaPlot 11.0 por medio de la obtención de los promedios de cada una de las concentraciones determinadas (100, 50, 25, 18.75 y 12.5 µM) para la estandarización de las curvas, el cual fue realizado mediante análisis cuantitativo de muestreo usando cuatro parámetros de logística, función matemática que aparece en diversos modelos de crecimiento de poblaciones proporcionando una estimación corregida para las curvas sigmoides, el crecimiento de una magnitud; limita la interacción entre los distintos parámetros, debido al aumento de los datos estándar (concentración, respecto al % de viabilidad) se representan en un eje semi-log. Las concentraciones de las muestras se determinan a partir del ajuste con cualquier la tendencia del factor de dilución. Por lo tanto, La IC₅₀ es una función en relación a la concentración de las nanopartículas con los compuestos LQM y el tiempo de exposición que tienen con la población celular.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación, se muestran en la Tabla 6 los resultados obtenidos para la determinación de la optimización de los sistemas de nanopartículas de PLGA para los LQM, presentados mediante el diseño experimental elaborado por medio de software estadístico de forma aleatorizada.

Tabla 6. Diseño experimental multifactorial aleatorizado

Sistema	PLGA (mg)	Cantidad de LQM (µM)	PVA (%)	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Carga de LQM (%)	Potencial zeta (mv)
1	100	50	3	211.3	0.073	89.66	-2.89
2	50	50	3	186.7	0.059	89.89	-5.04
3	75	50	3	184.6	0.046	89.75	-5.73
4	75	25	1	132.9	0.075	92.55	-3.57
5	50	25	3	191.4	0.074	90.51	-1.02
6	50	25	1	131.2	0.012	89.77	-7.38
7	75	25	3	195.1	0.003	92.6	-1.50
8	50	50	1	135.2	0.042	91.15	-6.24
9	75	50	1	134.2	0.004	91.13	-4.02
10	100	50	1	143.5	0.055	91.21	-3.89
11	100	25	1	149.6	0.058	89.5	-3.87
12	100	25	3	182.1	0.073	92.6	-2.17

Continuación Tabla 6. Diseño experimental multifactorial aleatorizado

13	75	50	1	127.3	0.005	91.38	-3.85
14	100	50	1	141.1	0.050	91.82	-3.79
15	100	25	1	147.5	0.054	89.66	-3.94
16	75	50	3	182.5	0.062	90.75	-5.21
17	50	50	1	130	0.054	92.6	-6.24
18	100	25	3	180.5	0.073	90.76	-1.85
19	50	25	3	188.8	0.087	91.9	-0.907
20	75	25	1	130.7	0.077	91.6	-3.58
21	50	25	1	133.7	0.026	89.46	-7.31
22	50	50	3	186.3	0.039	92.6	-5.02
23	100	50	3	221.3	0.077	89.74	-2.86
24	75	25	3	187.6	0.039	91.34	-1.48

En la Tabla 6, se observa cada uno de los sistemas construidos donde se evalúa el tamaño de partícula obtenido, carga del LQM y el potencial zeta de cada sistema. Donde las variables a determinar en los diferentes sistemas son: la cantidad de PLGA, cantidad de LQM y % de PVA. Se puede observar que los sistemas elaborados con PVA al 1% presentan un tamaño de partícula mucho menor, en comparación a los sistemas elaborados con PVA al 3% siendo este una variable importante en la elaboración de los sistemas de nanopartículas. Se debe considerar al PVA como una variable que dependiendo del porcentaje implica un cambio en el tamaño de partícula durante la elaboración de las nanopartículas de PLGA, ya que a un menor porcentaje de este el tamaño de partícula será de menor tamaño, considerándose 1% como la cantidad ideal para las condiciones de elaboración del vehículo.

La cantidad de PLGA y del LQM no han sido un factor que afecte el tamaño de partícula o el potencial zeta, sin embargo se debe considerar una relación entre el PLGA y la cantidad de LQM a encapsular para poder tener una correcta carga de las nanopartículas. Por lo tanto, los sistemas ideales para tener el mejor método de elaboración de los sistemas de nanopartículas para los compuestos LQM serían todos los sistemas que se elaboraron a la condición de 1% de PVA, considerando la carga de LQM es necesaria 75 mg para encapsular las concentraciones de LQM adecuadas, destacando los **sistemas 9 y 13** como óptimos para la elaboración de las nanopartículas de PLGA con los compuestos LQM.

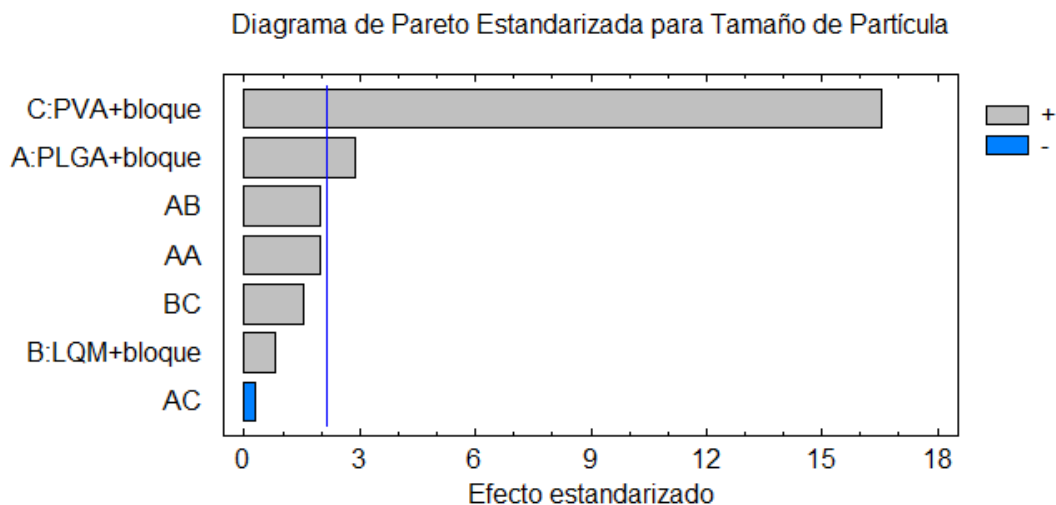
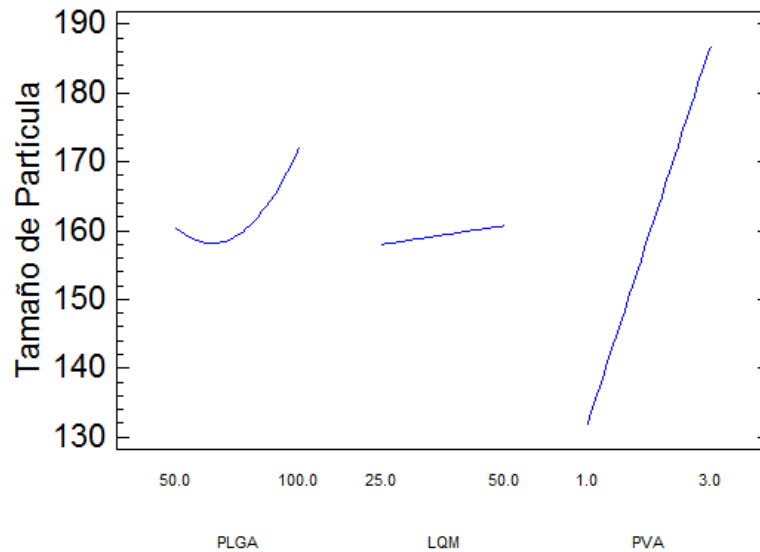


Diagrama 1. Estandarización para tamaño de partícula

En el Diagrama 1, se observan las interacciones que se presentan entre cada una de las variables presentes en este experimento, donde se presenta una influencia destacada del PVA, referenciada con la letra C. El aumento en la cantidad de PVA es un factor influyente en la determinación del tamaño de partícula, comparando con A: PLGA y B:LQM los cuales no son una variable determinante para la elaboración de las nanopartículas de PLGA obteniendo un tamaño de partícula óptimo .

El empleo de un diseño experimental multivariable permite conocer la relación entre los componentes con los cuales se elaboran las nanopartículas de PLGA, permitiendo observar que factor o factores pueden presentar una respuesta considerable en el tamaño de partícula. El tamaño de partícula es un factor crítico para que las nanopartículas cargadas con los compuestos permitiendo que estas puedan penetrar al interior de la célula; así mismo dependerá la forma que las nanopartículas tengan para facilitar que se internalicen dentro de la célula. El tamaño de partícula favorece la cinética de liberación, permitiendo que la velocidad de liberación sea más rápida a menor tamaño de partícula (Álvarez, 2002).

Gráfica de Efectos Principales para Tamaño de Partícula



Gráfica 3. Efectos en el tamaño de partícula de los componentes de las nanopartículas

Los siguientes resultados describen la relación que existe entre la cantidad de PLGA, carga del LQM y la concentración de PVA, conociendo la influencia que tiene cada una de estas variables en el tamaño de partícula. La Gráfica 3 muestra el efecto generado por las variables antes mencionadas, observando un aumento en el tamaño de las nanopartículas al aumentar el porcentaje de PVA del 1% al 3%, observándose considerablemente afectado. El PVA ha sido el agente estabilizante más empleado para la preparación de nanopartículas biodegradables, y el cual previene la agregación de partículas durante la postpreparación dependiente de la afinidad del polímero con el agente estabilizante, las cuales presentan grupos funcionales polares que por medio del agente estabilizantes evitan la agregación por interacciones iónicas (F. Rocha Formiga, 2009). Es necesaria la presencia del agente estabilizante para evitar fenómenos de coalescencia y formación de aglomerados.

La tendencia que presenta el tamaño de partícula de las nanopartículas de PLGA con los compuestos LQM para cada variable se presenta en la Gráfica 3, y el impacto que tiene el PVA al tamaño de partícula. El tamaño de la nanopartícula aumenta drásticamente con un aumento en la concentración de PVA, por lo cual el % de PVA es una variable a controlar para poder tener un tamaño adecuado para la elaboración de las nanopartículas, en el cual se obtiene un aumento considerable en un 40% al elaborar las nanopartículas con PVA al 3%. El diámetro medio de las nanopartículas de PLGA aumenta al incrementar la concentración de PVA. El efecto se relaciona con las elevadas concentraciones de PVA (2-6% p/v), que aumenta la viscosidad del medio acuoso y disminuye la velocidad de difusión del disolvente (F. Rocha Formiga, 2009). Esto se debe a que existe una fuerte adsorción del PVA en la superficie de las nanopartículas de PLGA, ya que los grupos hidroxilo de las moléculas del PVA interaccionan con los grupos éster del PLGA mediante una unión hidrofóbica.

5.1 Optimización del método de preparación para las nanopartículas con LQM

Meta: minimizar Tamaño de Partícula

Valor óptimo = 126.641 nm

Tabla 7. Optimización de la Respuesta

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
<i>PLGA (mg)</i>	50	100	56.0256
<i>LQM (μM)</i>	25	50	50
<i>PVA (%)</i>	1	3	1

La Tabla 7 presenta cada uno de los factores involucrados en la preparación de las nanopartículas, permitiendo obtener las condiciones óptimas para la elaboración de las nanopartículas obtenidas mediante el análisis estadístico multivariable por medio de software Statgraphics para cada uno de los compuestos LQM.

Estos factores permiten conocer los valores óptimos para la elaboración del método de preparación de las nanopartículas que favorezcan en el encapsulamiento de los compuestos LQM. No solo puede favorecer la elaboración de las nanopartículas con los compuestos LQM, permite optimizar la cantidad de material que se utiliza en la preparación de las nanopartículas, disminuyendo los costos de producción.

Este método presenta muchas ventajas, presentando excelentes rendimientos del proceso, la posibilidad de encapsular principios activos termolábiles, adaptación a gran escala, sin embargo, esta exclusivamente limitada a fármacos lipofílicos. Debido a la característica lipofílica de los compuestos LQM, permitiendo que este método sea favorable para el encapsulamiento de estos compuestos.

Tabla 8. Características de la nanopartículas cargadas con los compuestos LQM para pruebas biológicas

<i>LQM</i>	<i>PLGA (mg)</i>	<i>PVA (%)</i>	<i>Tamaño de partícula (nm)</i>	<i>Índice de polidispersión</i>	<i>Carga de LQM (%)</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>
<i>Control</i>	75	1	160.53	0.0626	-	-12.06
<i>717</i>	75	1	158.2	0.0666	89.4685	-9.86
<i>731</i>	75	1	177.5	0.0770	89.4026	-10.37
<i>738</i>	75	1	194.2	0.0493	92.1726	-9.72
<i>755</i>	75	1	173	0.0516	92.6078	-9.72

Los resultados de la optimización del método de preparación para las nanopartículas finales con los compuestos para su evaluación en las líneas celulares de queratinocitos (HaCaT) y células de cáncer de próstata (PC-3) evaluando las características de tamaño de partícula, potencial zeta y carga de los compuestos se presentan en la Tabla 8.

De las cuales se optimizó adecuadamente las características del tamaño de partícula y potencial zeta, obteniéndose tamaños < 200 nm y potencial zeta con una media de -9.91 mV. El porcentaje de carga fue afectado debido a que se utilizó 75 mg de PLGA, sin embargo, se obtiene un alto porcentaje de carga teniendo una media del 90 %, las cuales son óptimas para su uso en pruebas *in vitro*.

Se elaboraron las nanopartículas con los factores optimizados para la preparación de los sistemas para los compuestos LQM. Los resultados obtenidos mostrados en la Tabla 8, indican que las nanopartículas presentan un tamaño promedio entre los 158.2 y 194.2 nm, para cada compuesto las distribuciones son muy reducidas, una carga del 89.46-92.60 % y los valores del potencial zeta proporciona la carga superficial que tienen las nanopartículas, que presentaron un carga negativa entre -9.72 a -12.06 mV. Permitiendo proceder a realizar las pruebas biológicas en las líneas celulares de queratinocitos (HaCaT) y cáncer de próstata (PC-3).

El método de elaboración permite tener un gran porcentaje de encapsulamiento, eficaz para los fármacos lipofílicos. Los resultados presentan un porcentaje de captación entre el 89.46 al 92.60 %, al disolver el compuesto en acetona, disolvente en el cual los compuestos LQM son solubles y miscible en agua permite la difusión del compuesto y formación de las nanopartículas a una agitación constante, siendo un método con un alto porcentaje de encapsulamiento que garantiza la encapsulación de los compuesto LQM en nanopartículas biodegradables de PLGA.

En la determinación del potencial zeta para los compuestos se obtuvieron valores entre los -9.72 y -12.06 valores estables para las nanopartículas. Esta repulsión evita que estas se aglomeren. El potencial zeta describe el comportamiento de una dispersión coloidal estabilizada eléctricamente. Valores alrededor de +/- 30 mV son típicos de sistemas coloidales estables. Los valores < -30 mV corresponden a micelas negativamente estables. La formación de agregados suele ocurrir cuando las mismas fuerzas de van der Waals son dominantes, lo que resulta en una reducción de los valores del potencial zeta y la pérdida de estabilidad del sistema.

El potencial zeta es afectado, al aumentar la concentración de PVA presentando un potencial más cercano al cero al presentarse una mayor concentración estabilizando una mayor cantidad de cargas. Las partículas suspendidas forman la aglomeración de las nanopartículas unidas por medio de fuerzas de van der Waals, los resultados obtenidos indican la presencia de nanopartículas estables con una carga superficial negativa las cuales permanecen estables en el medio, evitando su aglomeración.

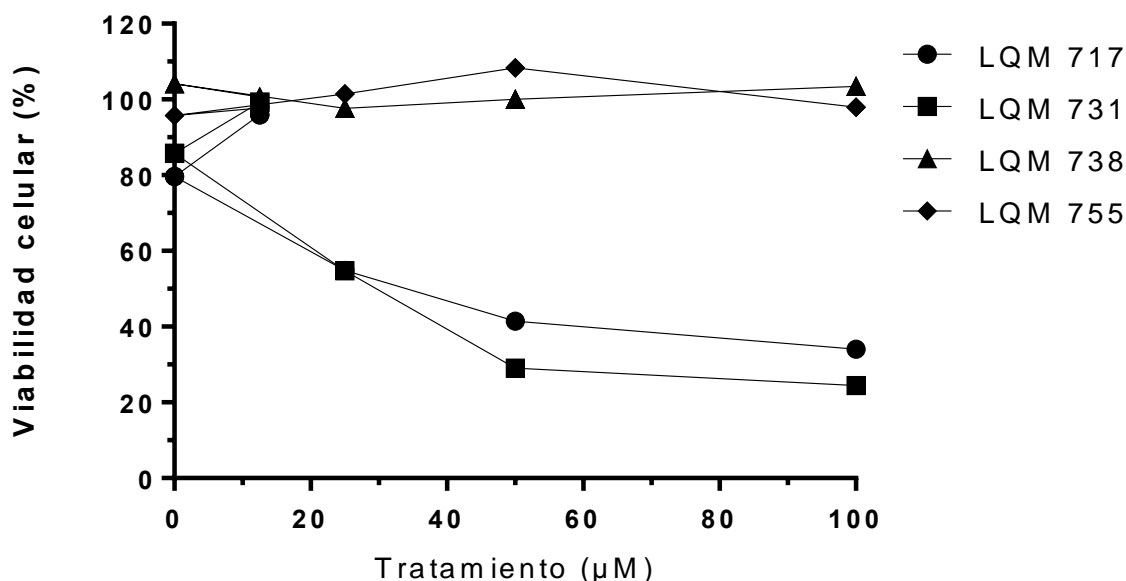
5.2 Viabilidad celular de queratinocitos (HaCaT) expuestos a las nanopartículas cargadas con los compuestos LQM 717, 731, 738 y 755 estimada por la técnica de exclusión de azul tripano

En la Tabla 9. se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad de los queratinocitos expuestos a las nanopartículas de los cuatro compuestos, en un tiempo de exposición de 24 horas, en el cual se observa que los compuestos LQM 738 y 755 no presentan un efecto citotóxico, conservándose el 100% de viabilidad de los queratinocitos. Mientras que los compuestos LQM 717 y 731 presentan una alta viabilidad a la dosis más baja, 95.93% y 99.26% respectivamente.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con los compuestos LQM 717, 731, 738 y 755 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)				
		12.5 μM	18.75 μM	25 μM	50 μM	100 μM
LQM 717	24 horas	95.93	79.67	54.88	41.45	34.07
LQM 731	24 horas	99.26	85.72	54.78	29.095	24.4183
LQM738	24 horas	100.64	104.20	97.64	100.08	103.49
LQM755	24 horas	97.72	95.77	101.4	108.30	97.90

Viabilidad celular HaCaT con compuestos LQM



Gráfica 4. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con LQM a concentraciones de 12.5 μM , 18.75 μM , 25 μM , 50 μM y 100 μM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano.

En la Gráfica 4 se observa el comportamiento de la viabilidad celular que presentan los queratinocitos (HaCaT) ante cada una de las concentraciones utilizadas de cada compuesto. Los cuales se evaluaron en al cumplir un periodo de 24 horas de exposición de los compuestos encapsulados en nanopartículas biodegradables de PLGA frente esta línea celular.

5.3 Viabilidad celular de células de cáncer de próstata (PC-3) expuestos a las nanopartículas cargadas con los compuestos LQM 717, 731, 738 y 755 estimada por la técnica de exclusión de azul tripano

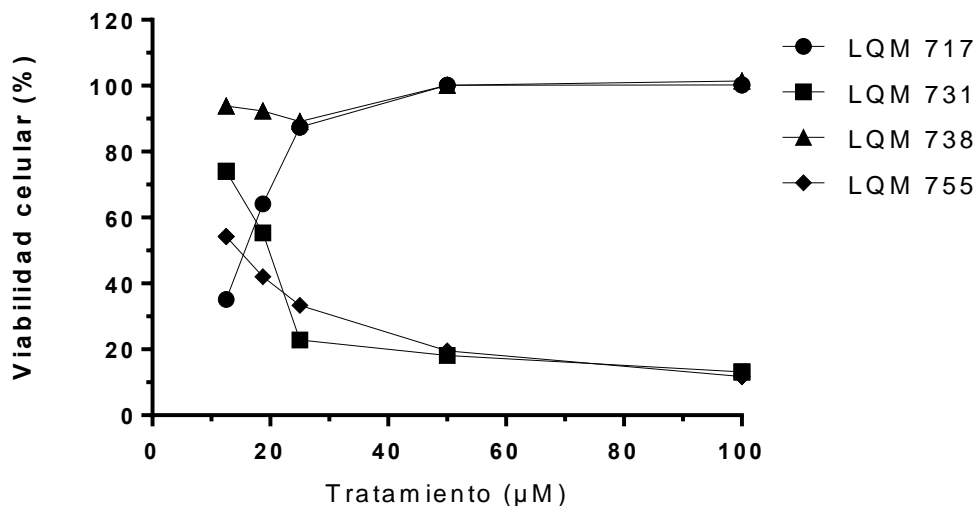
En la Tabla 10. se muestran los resultados de la evaluación de la viabilidad que presentan las células de cáncer de próstata (PC-3) ante la exposición con las nanopartículas cargadas con los cuatro compuestos, en un tiempo de exposición de 24 horas, donde se observa que los compuesto LQM 717, 731 y 755 presentan actividad citotóxica, teniendo encuentra que el compuesto LQM 717 presenta un porcentaje de viabilidad mucho mejor que los demás compuestos con un 35.14% a la concentración de 12.5 μM , sin embargo este efecto se pierde cuando se va aumenta la concentración, considerando este como un efecto citostático. Por el contrario, el compuesto LQM 738 no afecta a la viabilidad de esta línea celular.

Los compuestos LQM 731 y 755 presentan una viabilidad de 55.38% y 42.07% respectivamente a una concentración de 18.75 μM , aumentando la concentración se puede observar una alta disminución de la viabilidad de las células de cáncer de próstata llegando a presentar una viabilidad de 13.13% para el LQM 731 y de 11.78% para el compuesto 755 a una concentración de 100 μM , estos resultados permiten a estas 2 moléculas ser buenos candidatos para realizar más estudios para el tratamiento del cáncer prostático.

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de cáncer de próstata (PC-3), tratadas con los compuestos LQM 717, 731, 738 y 755 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)				
		12.5 μM	18.75 μM	25 μM	50 μM	100 μM
LQM 717	24 horas	35.14	64.17	87.40	100.13	100.28
LQM 731	24 horas	74.08	55.38	22.86	18.19	13.13
LQM738	24 horas	93.80	92.34	89.17	100.18	101.49
LQM755	24 horas	54.26	42.07	33.36	19.56	11.78

Viabilidad celular PC-3 con compuestos LQM



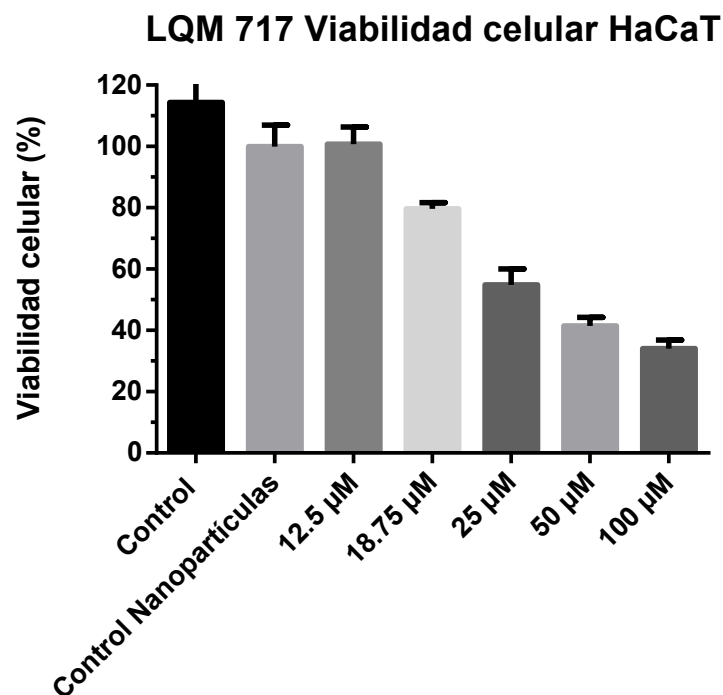
Gráfica 5. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con LQM a concentraciones de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 18.75 µM y 12.5 µM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

En la Gráfica 5 se observa el comportamiento de la viabilidad celular que presentan las células de cáncer de próstata (PC-3) ante cada una de las concentraciones utilizadas para cada compuesto. Los cuales se evaluaron al cumplir un periodo de 24 horas de exposición de los compuestos encapsulados en nanopartículas biodegradables de PLGA frente esta línea celular.

5.4 Viabilidad celular de cada una de las líneas celulares: queratinocitos (HaCaT) y cáncer de próstata (PC-3) expuesta al compuesto LQM 717 estimada con la técnica de exclusión azul de tripano

Tabla 11. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con el compuesto LQM 717 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

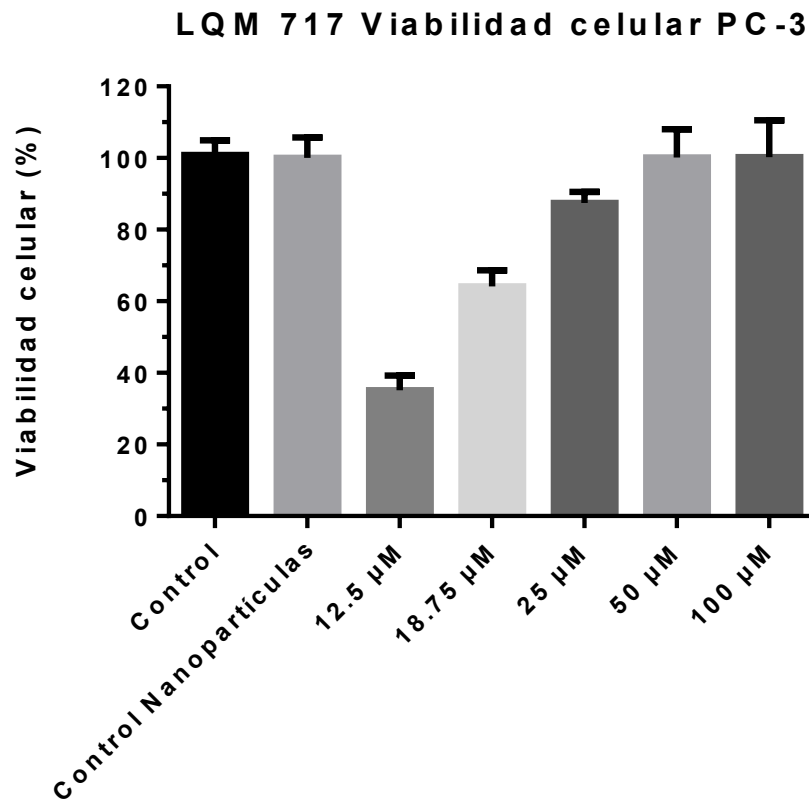
Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 µM	18.75 µM	25 µM	50 µM	100 µM
717	24 horas	121	100	100	81.49	60.5	41.49	33.22
		100	100	91.74	78.93	59.83	41.57	37.44
		121	100	78.93	81.65	58.18	45.79	36.61
		120.66	87.6	111	79.4	50.2	38.2	34.8
		127.27	104.13	98	80.2	50.2	40.2	32.2
		95.87	108.26	-	76.4	50.4	-	30.2



Gráfica 6. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con LQM 717 a concentraciones de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 18.75 µM y 12.5 µM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Tabla 12. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con el compuesto LQM 717 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 µM	18.75 µM	25 µM	50 µM	100 µM
717	24 horas	99.28	99.28	38.01	61.08	83.86	97.38	91.99
		98.33	100.5	39.33	62.65	90.58	92.28	94.26
		107.78	100.22	37.63	64.29	86.04	93.22	104
		101.99	101.99	35.95	72.01	83.96	114.05	96.02
		101.99	90.05	29.98	59.95	90.05	101.87	119.43
		96.02	107.96	29.98	66.04	89.93	101.99	96.02



Gráfica 7. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con LQM 717 a concentraciones de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 18.75 µM y 12.5 µM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Para el compuesto LQM 717 se puede observar un efecto concentración-respuesta al exponer a los queratinocitos (HaCaT) con las nanopartículas con el compuesto LQM 717 y el cual no presenta un efecto considerado a su concentración más baja de 12.5 µM. Comparando los resultados obtenidos en la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) este presenta un caso interesante, la curva de concentración-respuesta describe un comportamiento lineal a las concentraciones de 12.5 µM, 18.75 µM y 25 µM a las 24 horas, posteriormente en las concentraciones 50 µM y 100 µM se desarrolla una fase estacionaria asintótica al eje de las abscisas. A diferencia de los resultados obtenidos por parte de los otros compuestos LQM, este compuesto presenta la inducción de un efecto citostático (Agirreetxe, 2012). Se observa que la exposición de las células PC-3 ante el compuesto LQM 717 encapsulado en nanopartículas de PLGA presenta un efecto rápido debido, al presentar en un periodo de 24 horas una inducción de viabilidad celular superior al 50% a concentraciones bajas del compuesto LQM 717.

Los citostáticos inhiben de manera directa o indirecta la duplicación del DNA en la fase S del ciclo celular. Existen 2 grupos que pueden ejercer un cambio en el DNA; el grupo A impide la transcripción y la replicación del DNA, mientras que el grupo B inhibe la síntesis de los

precursores del DNA (Koolman & klaus-Heinrich, 2004). Estas sustancias afectan a las células que tienen un aumento en la división celular (mitosis). Por lo tanto, las células malignas que se dividen rápidamente presentándose un daño. El daño ocasionado que afecta al DNA, no solo puede frenar la proliferación; sino también puede desencadenar el fenómeno de apoptosis (Lüllmann , Mohr, & Lutz , 2010).

Las células con un alto índice de mitosis también son afectadas por este tipo de sustancias, afectándolos de manera obligada. Los queratinocitos son células que están en una continua proliferación por lo cual estas células se ven afectadas. El compuesto LQM 717 resulta ser inespecífico, debido a que puede afectar a las células de cáncer de próstata como a las células con mayor tasa de replicación, por lo tanto, se debe tener un control de la dosis a administrar para ocasionar la menor toxicidad posible.

La terapia contra el cáncer, permite no solo el tratamiento con un solo antineoplásico, sino la combinación de estos, por lo tanto, la valoración de un tratamiento con un citostático ayuda a inhibición de la proliferación del tumor, mientras que una molécula citotóxica proporcionaría la inducción de la apoptosis a mas células cancerígenas, permitiendo obtener mejores resultados y un tratamiento más corto.

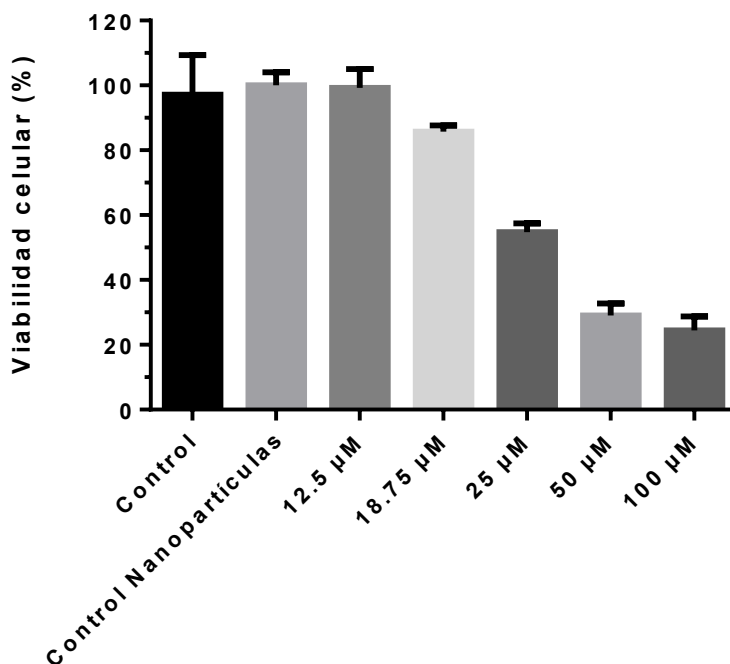
Así mismo el LQM afecta a ambas líneas celulares, este compuesto no representa ser un candidato a posible tratamiento del cáncer prostático, a pesar de presentar una IC₅₀ a una concentración baja.

5.5 Viabilidad celular de las líneas celulares: queratinocitos (HaCaT) y cáncer de próstata (PC-3) expuesta al compuesto LQM 731 estimada con la técnica de exclusión azul de tripano

Tabla 13. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con el compuesto LQM 731 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 µM	18.75 µM	25 µM	50 µM	100 µM
731	24 horas	108.82	101.47	104.41	88.53	54.12	32.65	27.55
		108.82	100.59	104.41	86.76	58.63	32.35	24.31
		104.12	97.94	92.84	84.41	56.27	31.47	23.14
		80.75	93.3	101.34	85.25	52.36	25.5	20.19
		95.31	105.36	93.3	83.65	52.52	28.31	31.13
		85.25	101.34	-	-	-	24.29	20.19

LQM 731 Viabilidad celular HaCaT

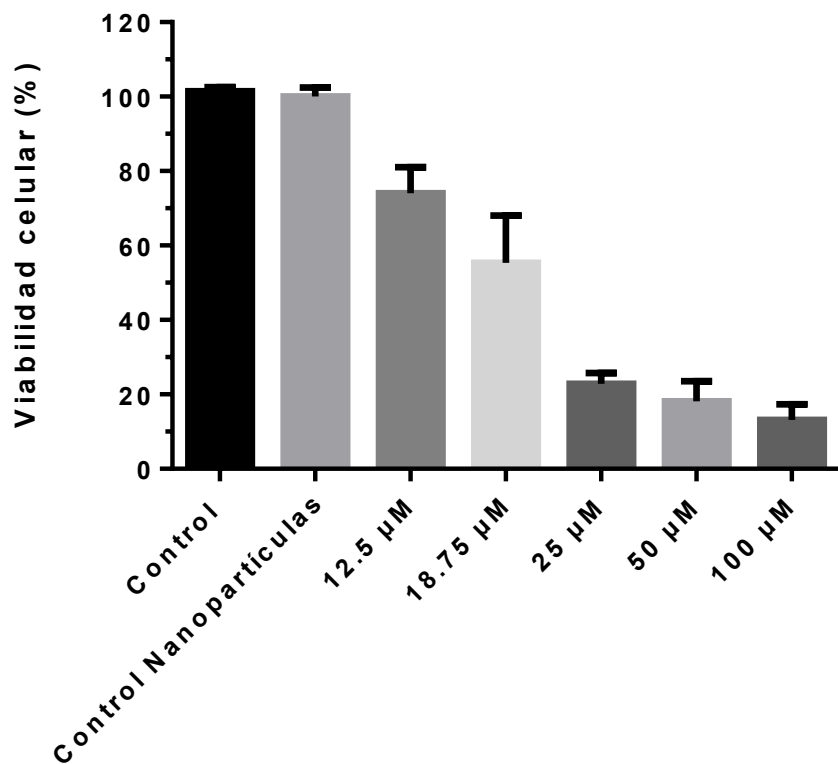


Gráfica 8. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con LQM 731 a concentraciones de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 18.75 µM y 12.5 µM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Tabla 14. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con el compuesto LQM 731 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 µM	18.75 µM	25 µM	50 µM	100 µM
731	24 horas	100.42	100.42	81.33	75.22	25.07	23.83	15.34
		101.7	96.05	81.7	59.5	25.07	18.84	16.34
		101.12	103.53	67.17	62.49	19.2	25.07	18.84
		10083	100.42	71.82	46.55	20.37	13.47	9.49
		100.83	100.42	68.41	41.98	24.59	12.35	9.23
		103.57	99.17	-	46.55	-	15.63	9.58

LQM 731 Viabilidad celular PC-3



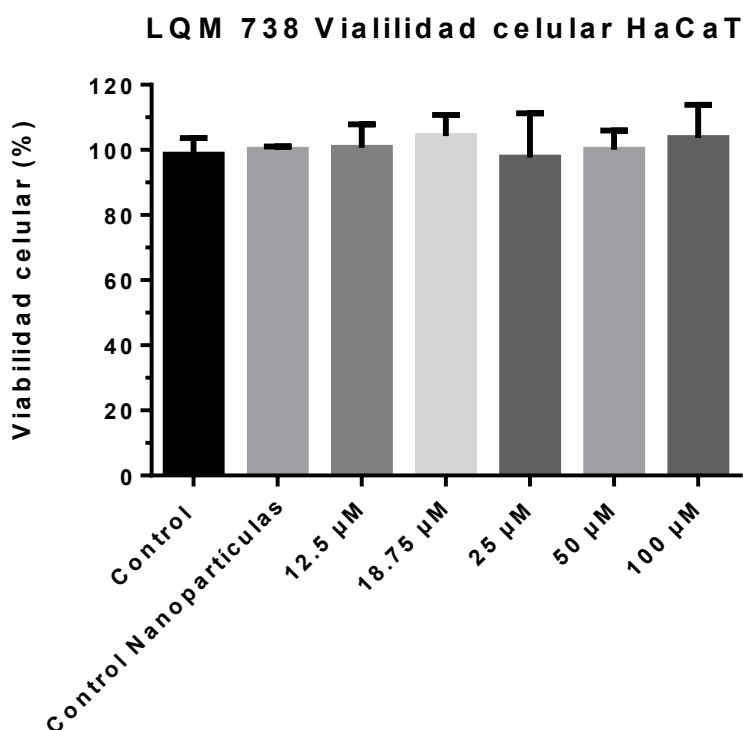
Gráfica 9. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con LQM 731 a concentraciones de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 18.75 µM y 12.5 µM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Las nanopartículas cargadas con el compuesto LQM 731 presentan una buena respuesta ante las dos líneas celulares evaluadas. Las líneas celulares al exponerlas a las nanopartículas cargadas con el compuesto LQM 731 por 24 horas presentan una disminución de la viabilidad de las líneas celulares, sin embargo; el compuesto presenta el efecto buscado, tanto en las células de cáncer de próstata como en los queratinocitos. Es importante considerar que este compuesto daña tanto a las células sanas como a las cancerígenas, ya que se pueden presentar otros efectos perjudiciales para el correcto funcionamiento de las células sanas. Este compuesto no presenta una alta especificidad ante las células cancerígenas ya que puede afectar a otros tipos de células.

5.6 Viabilidad celular de las líneas celulares: queratinocitos (HaCaT) y cáncer de próstata (PC-3) expuesta al compuesto LQM 738 estimada con la técnica de exclusión azul de tripano

Tabla 15. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con el compuesto LQM 738 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 μM	18.75 μM	25 μM	50 μM	100 μM
738	24 horas	92.69	99.09	110.24	104.75	115.72	107.5	120.29
		96.53	100	94.52	105.667	84.46	101.1	95.06
		94.33	100.91	92.93	110.05	90.36	104.75	105.67
		98.92	99.6	100.63	93.1	108.33	96.35	106.62
		103.19	101.48	104.91	107.47	89.33	99.77	91.22
		105.76	98.92	-	-	-	91.04	103.19



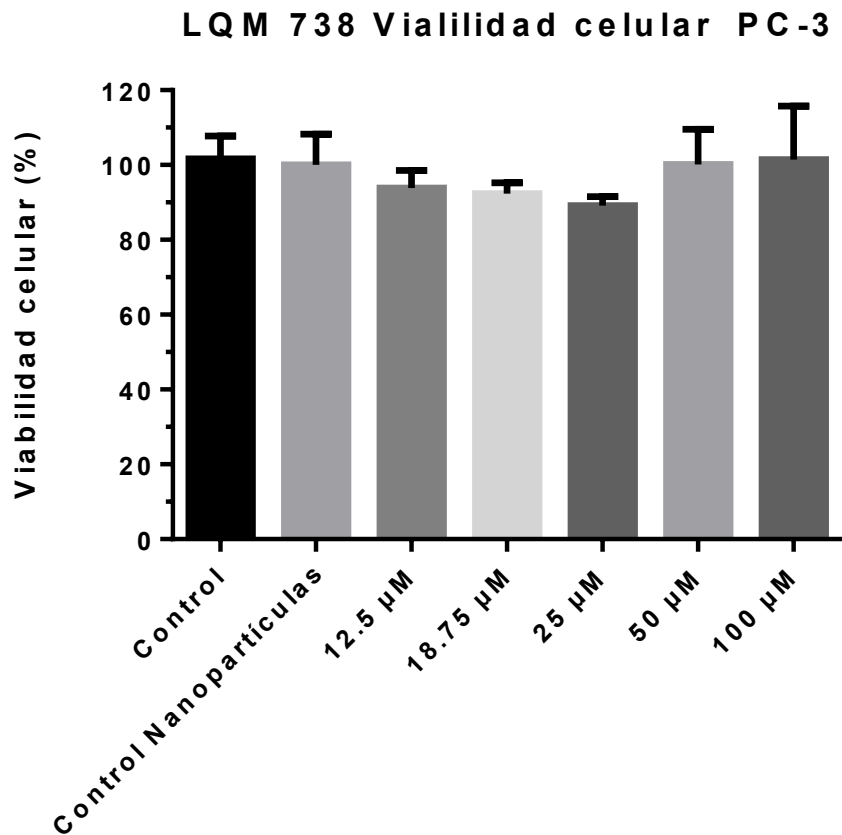
Gráfica 10. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con LQM 738 a concentraciones de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 18.75 μM y 12.5 μM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Tabla 16. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con el compuesto LQM 738 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Viabilidad celular (%)
-----------	------------------------

738

Tiempo de exposición	Control	Control nanopartículas	12.5 μM	18.75 μM	25 μM	50 μM	100 μM
24 horas	103.42	89.73	100	96.58	86.3	98.69	82.88
	100	110.27	90	90	89.73	103.42	89.73
	90	100	93.01	91.94	89.45	101.68	117
	105.62	100	88.71	90.86	9.94	102.69	108.06
	105.38	91.94	97.31	91.94	88.92	86.56	116.13
	105.38	108.06	-	-	88.71	108.06	95.16



Gráfica 11. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con LQM 738 a concentraciones de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 18.75 μM y 12.5 μM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

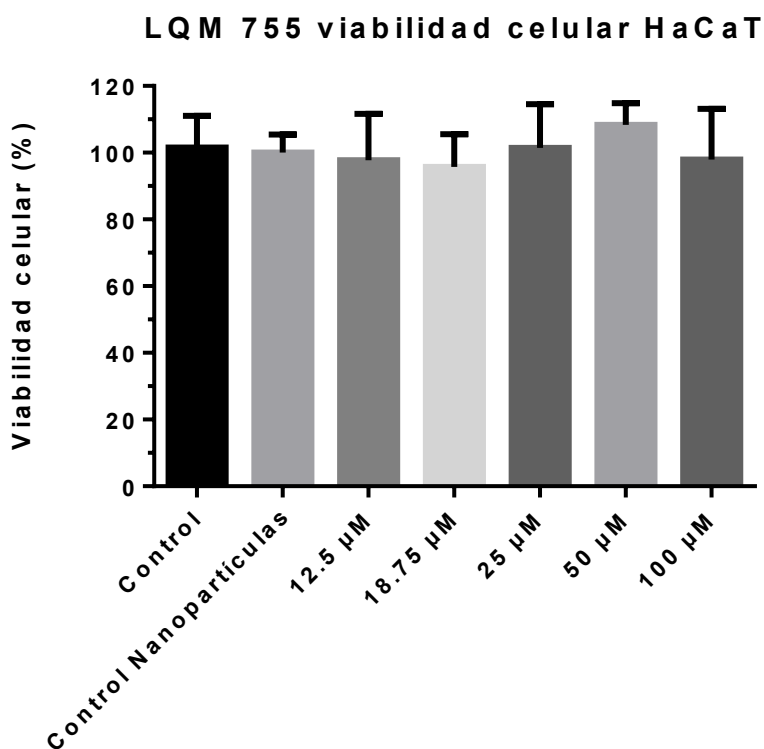
El compuesto LQM 738 expuesto en las líneas celulares de queratinocitos (HaCaT) y cáncer de próstata (PC-3) no presenta un cambio en la viabilidad de ambas células, los resultados obtenidos representan el efecto deseado a las concentraciones que se evaluaron como un agente sin actividad citotóxica. Así mismo no fue influyente el uso de las nanopartículas para obtener una disminución significativa de la viabilidad de ambas líneas celulares para ejercer un efecto tóxico ante las líneas celulares, por lo tanto permite ayudar principalmente en el transporte y absorción de las nanopartículas dentro de la célula para ejercer la actividad que

puede presentar este compuesto, lo cual el compuesto LQM 738 no presenta la actividad citotóxica que se buscaba, la cual fue determinada en las dos líneas: células de cáncer de próstata (PC-3) y queratinocitos (HaCaT) a las concentraciones evaluadas, por lo tanto se debe de evaluar este compuesto en otras líneas donde se puede encontrar y reportar el efecto deseado.

5.7 Viabilidad celular de las líneas celulares: queratinocitos (HaCaT) cáncer de próstata (PC-3) expuesta al compuesto LQM 755 estimada con la técnica de exclusión azul de tripano

Tabla 17. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con el compuesto LQM 755 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 μ M	18.75 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
755	24 horas	101.75	97.42	86.29	80.34	125.26	110.57	84.51
		115.05	106.47	96.65	102.36	102.68	107.47	120.46
		97.11	95.88	85.82	98.09	85.82	95.88	82.81
		89.93	107.34	99.94	105.9	99.57	112.89	101.79
		95.31	96.05	119.93	92.91	99.94	109.19	99.94
		110.12	96.61	-	-	95.13	113.82	-



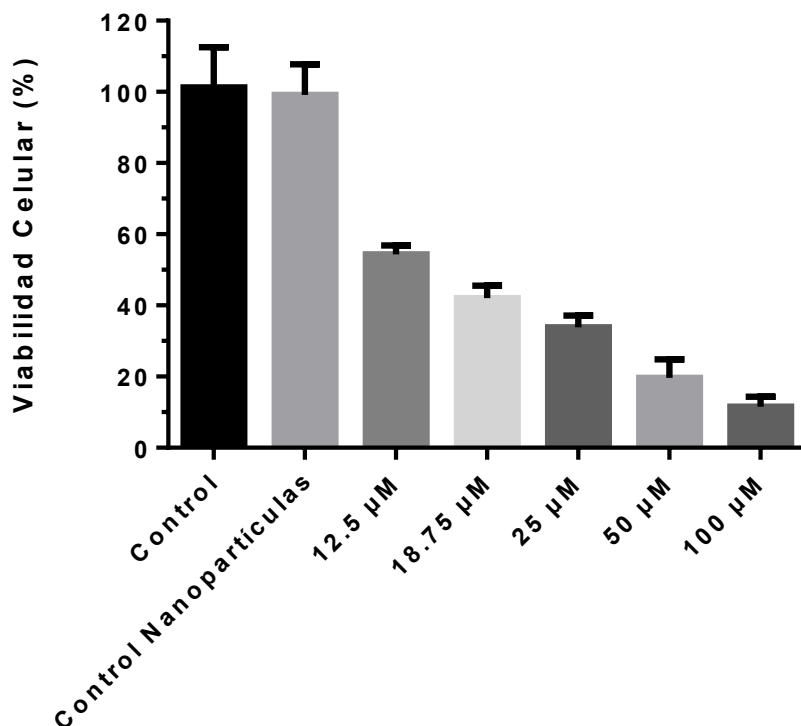
Gráfica 12. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT) tratadas con LQM 755 a concentraciones de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 18.75 μM y 12.5 μM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Los resultados que se obtuvieron por parte de las nanopartículas con el compuesto LQM 755 son favorables, la viabilidad de los queratinocitos se presenta de una forma óptima, ya que al exponer el compuesto a esta línea no se ve afectada por las nanopartículas a ninguna de las concentraciones evaluadas. Estos resultados permiten conocer que a las concentraciones evaluadas el compuesto no presenta un efecto tóxico en estas células sanas. Al no existir un cambio considerable en la viabilidad celular, permite conocer que no presenta un daño aparente a estas células, sin embargo, se tienen que evaluar otras líneas para conocer si presenta puede afectar a otras células.

Tabla 18. Porcentaje de viabilidad celular en línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con el compuesto LQM 755 a 24 horas de exposición y evaluadas por técnica de exclusión azul tripano

Compuesto	Tiempo de exposición	Viabilidad celular (%)						
		Control	Control nanopartículas	12.5 μM	18.75 μM	25 μM	50 μM	100 μM
755	24 horas	95.75	88.1733	56.34	42.43	35.26	28.24	8.50
		106.53	105.91	52.97	43.77	35.26	17.63	8.85
		97.70	106.31	52.97	45.87	28.24	16.37	12.36
		88.45	104.32	51.90	41.73	33.89	20.60	14.58
		117.76	91.34	57.61	36.48	36.53	15.62	13.54
		102.38	103.94	53.78	42.13	30.97	18.93	12.84

LQM 755 viabilidad celular PC-3



Gráfica 13. Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) tratadas con LQM 755 a concentraciones de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 18.75 µM y 12.5 µM durante 24 horas, evaluadas mediante técnica de exclusión azul tripano

Los resultados obtenidos para el compuesto LQM 755 presentes en las tablas 17 y 18, así como las gráficas obtenidas 12 y 13 destacan a este compuesto como el más eficaz, que presenta actividad citotóxica ante las células de cáncer de próstata y que al exponer las nanopartículas con el compuesto LQM 755 no se observó cambio en la viabilidad de los queratinocitos a las concentraciones evaluadas. Las células de cáncer de próstata presenta viabilidades debajo del 60% para la primera concentración (12.50 µM) en la cual se muestra que para alcanzar la IC_{50} no se necesitara incrementar demasiado la concentración del compuesto permitiendo manejar concentraciones bajas, y las cuales pueden favorecer al costo de producción, al necesitarse una menor concentración del compuesto este disminuye su costo, demás a una concentración menor permite que el compuesto sea menos toxico para las células sanas.

Las nanopartículas con el compuesto LQM 755 presentan un mayor efecto que los otros compuestos evaluados, siendo este un candidato para pruebas de inducción de la muerte programada, entre otros estudios. El LQM 755 presenta un eficaz efecto contra las células de cáncer de próstata, sin embargo, es necesario la evaluación en otras líneas de cáncer y pruebas *in vivo*.

5.8 Determinación de IC₅₀

Una vez determinada la actividad citotóxica de los compuestos LQM 717, 731, 738 y 755, se procedió a calcular la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) de cada uno de estos compuestos, tanto para las células sanas (queratinocitos sanos), como células de cáncer de próstata (PC-3); obteniendo así la concentración efectiva a la cual el compuesto inhibe el 50% de la población celular, siendo así más efectivas contra las células de cáncer de próstata y menor citotóxicas a los queratinocitos sanos mostradosse en la siguiente tabla la determinación de las IC₅₀ obtenidas de cada compuesto para cada una de las líneas del ensayo:

Tabla 19. IC₅₀ de los compuestos LQM

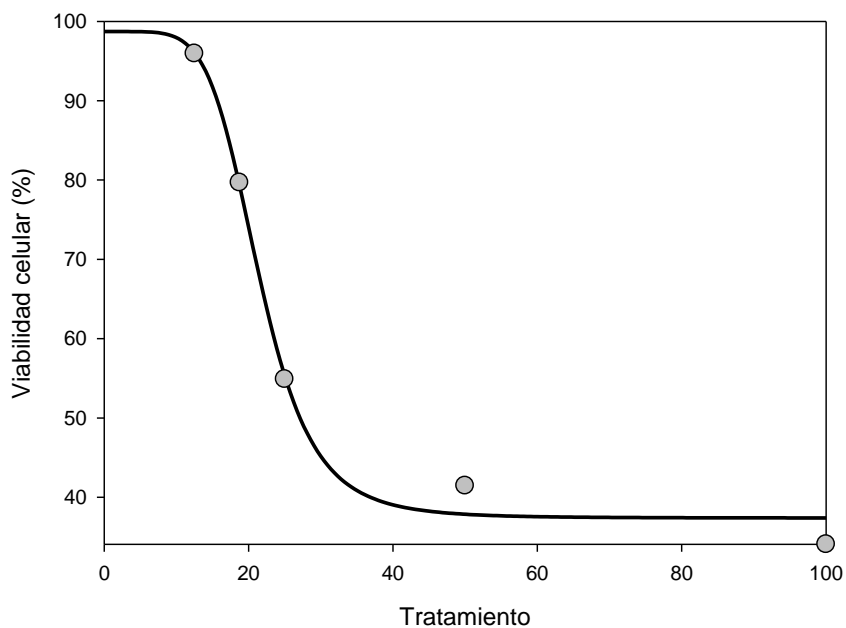
Línea celular	Tiempo (horas)	Compuestos			
		717	731	738	755
HaCaT	24	21.4436 µM	23.1982	-	-
PC-3	24	18.6916 µM	20.2484	-	12.8081

El tratamiento con cada uno de los compuestos cargados en las nanopartículas en células de queratinocitos sanos (HaCaT) resultó en una dosis inhibitoria dependiente de la concentración después de la exposición a 24 horas. Las concentraciones inhibitorias que causan una reducción del 50% de la población celular oscilan entre los 21.44-23.19 µM, mientras que la concentración para las células de cáncer de próstata (PC-3) oscila entre los 12-20.24 µM. La determinación de la IC₅₀ para cada uno de los compuestos se mencionan la Tabla 19, y en la cual el compuesto LQM 738 no presenta actividad a las concentraciones evaluadas en este experimento. Destacando el compuesto LQM 755 el cual presenta una IC₅₀ de 12.80 µM al estar expuestas en línea celular de cáncer de próstata (PC-3), mientras que para los queratinocitos no presenta un efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas.

El uso de las nanopartículas de PLGA como vehículo para los compuestos LQM genera ventajas para poder internalizar el compuesto dentro de la célula, existen numerosos artículos en los cuales utilizan DMSO como vehículo para los compuestos. El DMSO es una molécula anfipática con un dominio polar y 2 grupos metilo apolares por lo que es soluble tanto en medios acuosos y orgánicos. Es uno de los disolventes más comunes para la disolución de compuestos hidrófobos empleados en estudios *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, la concentración de este puede ser perjudicial para las células e interferir con el experimento, estudios de Richard J. Salvi *et al* (2008) reportan utilizar una concentración ≤ 0.25 %, al utilizar concentraciones mayores las células causa daño significativo a las células y reportándose inducción de apoptosis. Mediante el uso de las nanopartículas de PLGA se evita que las células presenten muerte por las concentraciones de DMSO necesarias para disolver los compuestos, la cual puede interferir en los resultados.

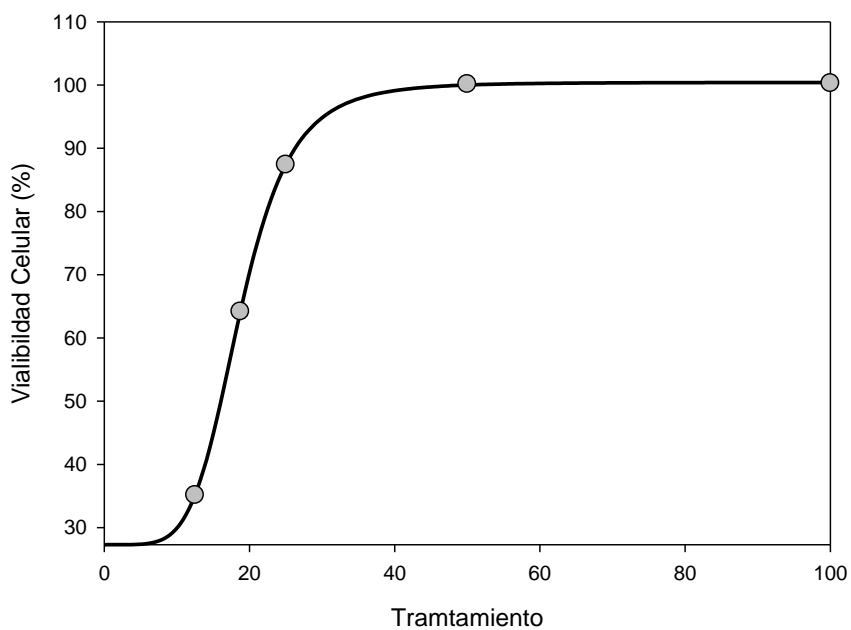
5.8.1 Compuesto LQM 717

Comportamiento del Compuesto LQM 717 contra HaCaT



Gráfica 14. Efecto Dosis respuesta del compuesto 717 al exponerlo ante línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT)

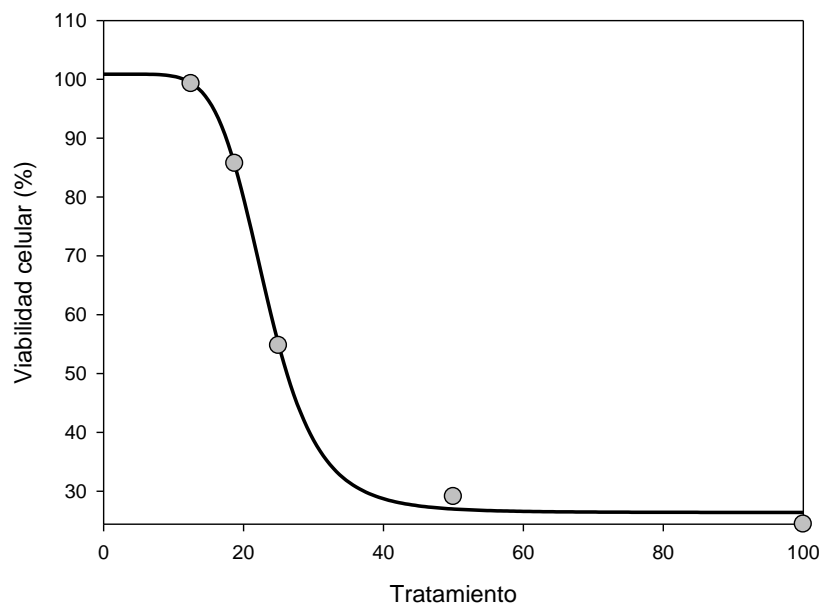
Comportamiento del Compuesto LQM 717 contra PC-3



Gráfica 15. Efecto Dosis respuesta del compuesto 717 al exponerlo ante línea celular de cáncer de próstata (PC-3)

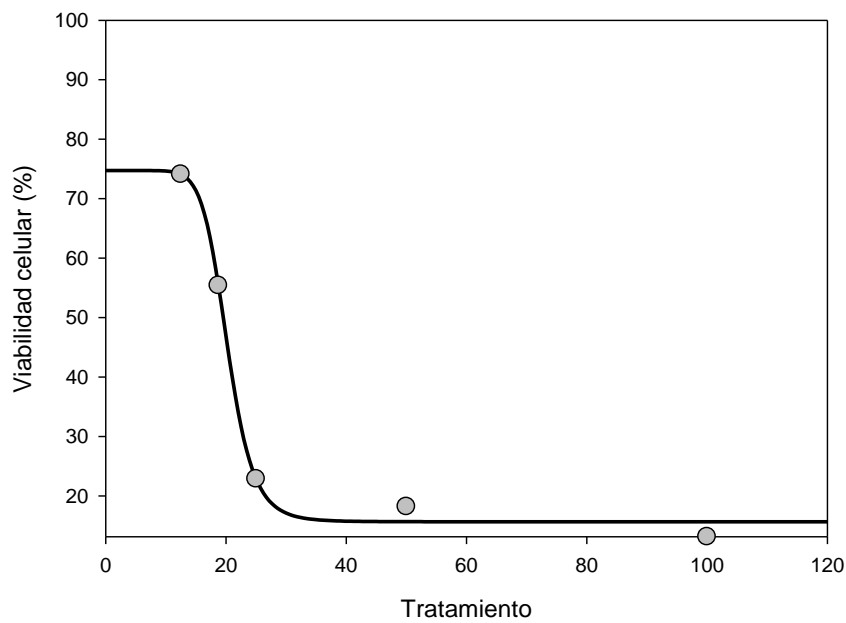
5.8.2 Compuesto LQM 731

Comportamiento del Compuesto LQM 731 contra HaCaT



Gráfica 16. Efecto Dosis respuesta del compuesto 731 al exponerlo ante línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT)

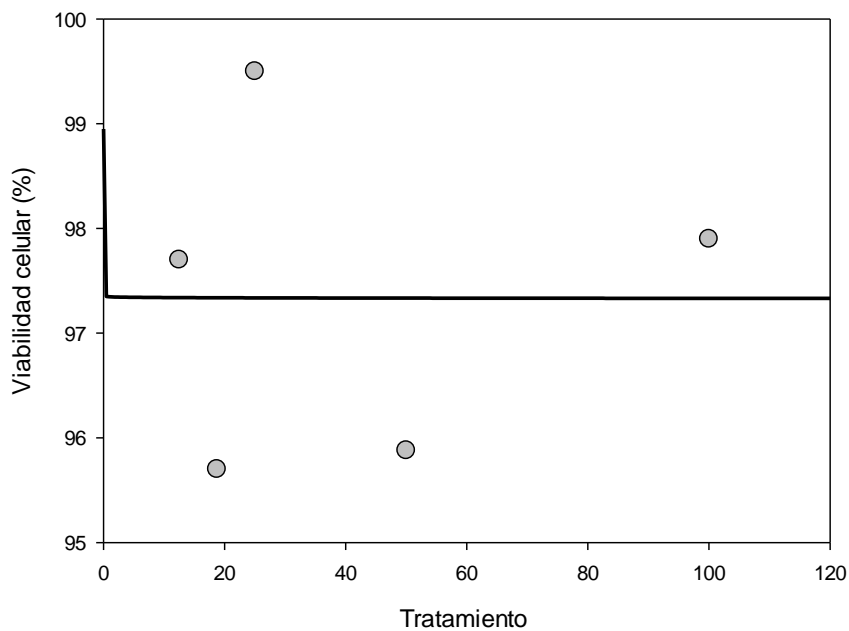
Comportamiento del Compuesto 731 contra PC-3



Gráfica 17. Efecto Dosis respuesta del compuesto 731 al exponerlo ante línea celular de cáncer de próstata (PC-3)

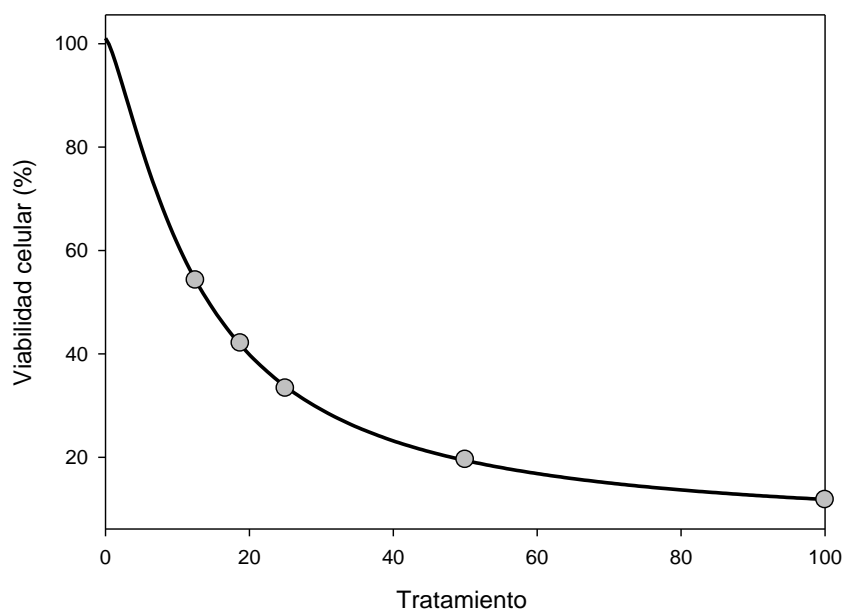
5.8.3 Compuesto LQM 755

Comportamiento del Compuesto 755 contra HaCaT



Gráfica 18. Efecto Dosis respuesta del compuesto 755 al exponerlo ante línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT)

Comportamiento del Compuesto 755 contra PC-3



Gráfica 19. Efecto Dosis respuesta del compuesto 755 al exponerlo ante línea celular de queratinocitos sanos (HaCaT)

El ácido cinámico como compuesto relacionado con el reino vegetal es utilizado por los seres humanos en diferentes productos. Derivados del ácido cinámico han resultado ser activos ante un amplio espectro de tumores tales como; melanoma, glioblastoma y adenocarcinomas de próstata y pulmón. Así mismo diversos derivados pueden inducir un efecto citostático y diferenciación en un amplio espectro de tumores (Wightman y Lighty, 1982)

Se ha reportado amplia actividad biológica de análogos, tales como actividad hepatoprotectora, antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria y antitumoral, de los derivados del ácido cinámico, sin embargo; este trabajo se limita principalmente al uso de nanopartículas biodegradables de PLGA como vehículo de cuatro compuestos LQM permitiendo evaluar la actividad citotóxica que puede presentar en línea celular de cáncer de próstata (PC-3) y queratinocitos (HaCaT) a diferentes concentraciones de 12.5 a 100 μ M. Determinando este efecto en un tiempo de exposición de 24 horas y evaluando el efecto citotóxico por medio de un marcador de viabilidad como la técnica de exclusión azul tripano. El diseño de moléculas cargadas en nanopartículas de PLGA como forma farmacéutica, no solo permite solucionar los problemas de solubilidad en cultivo celular, gracias a la caracterización de las nanopartículas se puede favorecer la absorción de estas por las células y así una óptima biodisponibilidad de los compuestos.

No se conoce el mecanismo por el cual estos compuestos induzcan un cambio en la expresión que lleve a la muerte a las células tumorales, por lo tanto es importante conocer el mecanismo de acción. Esto permite tener información de la vía por la cual estos derivados del ácido cinámico ejerce cambios de expresión genética y biológica en la células tumorales, de los cual no se han realizado publicaciones, sin embargo existen estudios de otros derivados del ácido cinámico que indican que actúa como factor transcripcional, especialmente en los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPARs); por lo tanto, derivados del ácido cinámico podría controlar los genes afectados a través de la activación de PPARs (Liu1995). Los genes dirigidos por PPARs son típicamente implicados en la regulación de los lípidos y la homeostasis de la glucosa, la proliferación y la diferenciación celular, y la inflamación (Salvatore Genovese, 2010). El estudio de este mecanismo en los compuestos sintetizados en el laboratorio de Química Medicinal, proporcionarían datos del mecanismo de acción farmacológico que tienen los compuestos para inhibir a las células cancerígenas.

El uso de PLGA como material de diseño de las nanopartículas permite ser utilizado como vehículo para los compuestos LQM considerándose grandes ventajas, tales como ser biocompatible y biodegradable; permitiendo la acción del compuesto durante su evaluación. La degradación del co-polímero se lleva a cabo por un proceso de hidrólisis, que afecta homogéneamente a toda la matriz del co-polímero permite la degradación del PLGA, la cual está relacionada con su hidrosolubilidad. La degradación permite comenzar con la liberación del compuesto dentro de la célula permitiéndole ejercer su mecanismo de acción que desencadena un efecto en porcentaje de viabilidad celular.

Los resultados obtenidos, favorecen el uso de los sistemas, en el cual se puede observar que un tamaño de partícula <200 nm es óptimo para internalizar los compuestos encapsulados en las nanopartículas dentro de la célula, permitiendo la evaluación del efecto en las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3) y queratinocitos (HaCaT).

La distribución del tamaño y el tamaño de las nanopartículas fueron determinados por la técnica de dispersión de luz dinámica (Light Scattering). El tamaño de partícula y de superficie, juega un papel importante en ensayos *in vitro* e *in vivo*, tales como la determinación del nivel de la captación, la difusión intersticial, y la capacidad para endocitar por parte de las células (Longmire, 2008). El tamaño de la nanopartículas es crucial para la captación endocítica, aunque no es posible establecer una tendencia general, puede afectar directamente el modo de endocitosis. La captación de partículas más pequeñas (hasta 200 nm) es mediada por clatrina, la endocitosis mediada por clatrina ha sido propuesta como la principal vía de entrada para nanopartículas menores a 200 nm (Wang Z, 2009), y la cual puede ser la vía por la cual los LQM cargados en nanopartículas penetran al interior de la célula. Los endolisosomas de las células al formarse una vez captadas las nanopartículas presentes en el medio, por medio de esterases libera el compuesto en los endolisosomas, posteriormente se desencadena la liberación del compuesto en el citosol a través del oxígeno presente en los endolisosomas (Huining He, 2015).

Mediante la evaluación de estos 4 compuestos, se observó que presentan la actividad citotóxica evaluada por medio de la viabilidad celular, sin embargo; se debe trabajar el mejorar la especificidad de las moléculas, disminuyendo la toxicidad y el daño a las células sanas, permitiendo disminuir los efectos secundarios que se pueden presentar.

Comparando las estructuras de los compuestos uno de los principales factores que se destaca en los compuestos LQM de la serie 700 es la incorporación de un elemento halógeno como sustituyente, son el cual favorece la presencia de actividad biológica como agente citotóxico, comparando los compuestos 738 y 755 se observa la presencia de actividad al incorporar Cloro (Cl), como sustituyente, así mismo la evaluación de otros compuesto con diferentes elementos halógenos permitiría conocer y evaluar la actividad biológica que pueden presentar moléculas con elementos con Flúor (F), bromo (Br) y Yodo(I).

Evaluando el efecto inhibitor del crecimiento en las células neoplásicas y la baja toxicidad que presentan en las células sanas, se obtiene un optima respuesta de LQM 717, 731 destacando el compuesto **LQM 755**; el cual presenta un mayor efecto citotóxico y selectividad ante las células de cáncer de próstata que a los queratinocitos, usados como control, a las concentraciones evaluadas.

Las nanopartículas de PLGA utilizadas como vehículo permiten proporcionar no solo la solubilización del compuesto, sino la entrega, absorción y liberación hasta el sitio de acción, permitiendo ser capaz de evaluar el efecto terapéutico pretendido.

Existen reportes de compuestos con actividad antitumoral en diversos tipos de cáncer, incluido el prostático, Hongbin Zou *et al* 2010 reportaron derivados del ácido cafeico en diverso tipos de cáncer con grupos funcionales aromaticos unidos al nitrogeno de la amida, favoreciendo la actividad de la molécula, oíteniendo buenas respuestas en las líneas estudiadas. Este estudio se realizo a 72 horas y obtuvieron una IC₅₀ de 91 µM, comparando estos resultados del equipo de Hongbin, los compuestos LQM lograron obtener una IC₅₀ entre 18-23 µM en un tiempo de 24 horas, resultados muy optimos para los compuestos sintetizados en el laboratorio de Quimica Medicinal concentraciones y tiempos mucho menores a los reportados por el equipo de Hongbin.

Mas recientemente el equipo de Andrii Lozynskyi *et al* 2014, evaluaron la actividad de diverso derivados del acido cinámico con actividad anti-tumoral en diversas lineas celulares entre la cuales se encuentran las células de cáncer de prostata y en las cuales obtuvieron una IC₅₀ de 51.43 M⁻⁵ incubando durante 48 horas que comparando las IC₅₀ de los compuestos sintetizados en el laboratorio de Quimica Medicinal, los compuestos LQM presentan actividad a una menor concentración ante las células tumorales de cancer de próstata a un tiempo de 24 horas. Presentandose como buenas moléculas candidatas a estudios *in vivo*. Se han obtenido buenos resultados que permiten dar por entendido que se tiene un serie de compuestos que presentan actividad antitumoral a concentraciones bajas. No existen reportes del uso de nanopartículas como vehículo para estos compuestos, por lo tanto existe un amplio campo de investigación que puede proporcionar mayores conocimientos del tema.

Los resultados obtenidos indican que algunos de los compuestos evaluados de la serie LQM 700 presentan un efecto citotóxico ante las células de cáncer de próstata (PC-3), y que por medio de estudios complementarios a 48 y 72 horas se puede optimizar las concentraciones de dichos compuestos, disminuyendo así la toxicidad ante las células sanas e influir un efecto citotóxico en el tumor. La serie LQM 700 resulta ser una línea de compuestos prometedores con actividad antitumoral ante el cáncer prostático.

De igual forma los compuestos cargados en nanopartículas de PLGA pueden ser evaluados en otras líneas celulares cancerígenas permitiendo conocer si presentan efecto citotóxico ante diferentes tipos de cáncer. Es necesaria la evaluación de otros compuestos de la serie LQM 700, que pueden presentar mejores resultados que los evaluados en este trabajo, o ser moléculas candidatas a otros estudios, como el compuesto LQM 755.

6. CONCLUSIONES

- Se logró analizar cuáles son las condiciones óptimas de elaboración de los sistemas de nanopartículas biodegradables de PLGA para de los compuestos 717, 731, 738 y 755
- Se obtuvo un diseño multivariable permitiendo la optimización para los sistemas de preparación de nanopartículas de PLGA con los compuestos LQM
- Se determinaron las características de los sistemas de nanopartículas de PLGA con LQM, obteniéndose carga del 90% del compuesto, tamaño de partícula < 200nm y potencial zeta entre -12.06 y -9.72 mV
- Se evaluó la actividad citotóxica de los 4 compuestos análogos del ácido cinámico en nanopartículas biodegradables de PLGA, en cultivo de células de cáncer de próstata (PC-3), mediante exclusión por azul tripano por 24 horas permitiendo conocer que los compuestos 717, 731 y 755 presentan actividad contra este tipo de cáncer
- Se evaluó la actividad citotóxica de los 4 compuestos análogos del ácido cinámico en nanopartículas biodegradables de PLGA, en cultivo de células de queratinocitos sanos (HaCaT) mediante exclusión por azul tripano por 24 horas permitiendo conocer que los compuestos 738 y 755 no presentan un daño considerable a estas células
- Se obtuvo la IC₅₀ de los compuestos, proporcionando una IC₅₀ de 12.8081 μM para el compuesto más eficaz contra las células cancerígenas (LQM 755) y presentando un menor daño a las células sanas.

7. PROSPECTIVAS

Los resultados fueron adecuados, sin embargo, se pueden mejorar, realizando estudios con la evaluación de otros factores que pueden ayudar a la optimización del método de preparación más adecuado. Así mismo se pueden comparar otros métodos de preparación de nanopartículas biodegradables de PLGA, comparando cual es el método de preparación más óptimo para encapsular los compuestos LQM.

Es recomendable en experimentos futuros, prolongar el tiempo de exposición del tratamiento, además de disminuir la dosis y realizando pruebas a 48 y 72 horas. Por lo tanto, al prolongar el tratamiento se esperaría una IC_{50} menor a la media obtenida de cada compuesto, obteniendo así concentraciones mínimas para la administración. Así mismo realizar pruebas para la detección de apoptosis, tales como la cuantificación de degradación internucleosomal por medio de ensayo de ELISA, detección del DNA mediante inmunohistoquímica o por método de TUNEL, detección de la expresión de algunas caspasas y evaluación de la simetría de la membrana celular por medio del marcaje con anexina V.

La síntesis de nuevos compuestos resulta muy importante, ya que son excelentes candidatos para realizar pruebas *in vivo*, evaluando el efecto citotóxico para combatir el cáncer de próstata, así mismo evaluar otros posibles efectos, tanto terapéuticos como secundarios que pueden presentar en los ensayos *in vivo*.

Las nanopartículas pueden presentar un efecto diferente en los ensayos *in vivo*, y que necesita ser tomado en cuenta, aportando especificidad para que las moléculas lleguen a su sitio de acción. Este problema se puede resolver mediante la PEGilación de las nanopartículas, y uso en la formulación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos dirigidos frente a epítomos propios sobreexpresados o expresados únicamente por el tumor permitiendo el aumento de la biodisponibilidad del fármaco en sitio de acción y reduciendo a la vez los efectos secundarios del tratamiento.

8. REFERENCIAS

1. aecc. (26 de Mayo de 2016). <https://www.aecc.es/>. Obtenido de <https://www.aecc.es:https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdeprostata/Paginas/cancerdeprostata.aspx>
2. aecc. (12 de Abril de 2016). <https://www.aecc.es/Paginas/PaginaPrincipal.aspx>. Obtenido de <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdeprostata/Paginas/anatomia.aspx>
3. Agirreetxe, I. R. (2012). *Estudio de la trabeculectomía experimental mediante implante de PLGA como dispositivo de liberación controlada de fármacos*. Tesis Doctoral: Universidad del País Vasco.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter. (2001). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
5. Álvarez, A. M. (16 de Junio de 2002). *Biofarmacia y farmacocinética Básica*. Obtenido de <http://www.innovacion.gob.sv/>: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3354/Biofarm-Farmacoc.pdf>
6. Álvarez-Blanco, E.-d. I.-T. (2008). Cáncer de próstata. *Revista Mexicana de Urología*, 68(4), 250-259.
7. Andrii Lozynskyi, B. Z. (2014). Synthesis and Anticancer Activity of New Thiopyrano[2,3-d]thiazoles Based on Cinnamic Acid Amides. *Scientia Pharmaceutica*, 723–733.
8. Arja, R. A. (2015). Cancer Screening. *Elsevier*, 78-82.
9. Arvizo RR, e. a. (2010). Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Lett*, 10:2543.
10. ATCC. (2012). NCI-PBCF-CRL1435 (PC-3). *American Type Culture Collection*, 1-24.
11. Bareford, L. M. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 748-758.
12. Bhatia, S. H. (2014). Mechanisms of cooperation in cancer nanomedicine: towards systems nanotechnology. *CellPress*, 448-455.
13. Boukamp, P. B. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology*, 761-771.
14. Burwell, S. M. (2014). Ionizing Radiation. *13th Report on Carcinogens*, 1-9.
15. Cadenas, R. Y. (2010). *Papel fundamental de cFLIP en el control de la apoptosis en células epiteliales de mama*. Centro Anadaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER): Tesis Doctoral.
16. Calderón, L. A. (2010). Diamond nanoparticles effect into corrosion resistance and microhardness of composite coatings with Nickel matrix. *Scientia et Technica*, 665-670.
17. Campbell-Walsh, W. A. (2010). *Urología* (10° edición ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
18. Cem Ekmekcioglu, J. F. (1998). Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Letters*, 137-144.
19. Charlotte W. Pratt, C. K. (2012). *Bioquímica*. México, D.F: El manual moderno.
20. Chia-Jui Weng, G.-C. Y.-L.-M.-L.-H. (2011). A comparative study on the effectiveness of cis and trans form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 281-287.
21. Claramunt Vallespí, R. M. (2013). Química bioorgánica y productos naturales. En M. d. Rosa María Claramunt Vallespí. Madrid: UNED. Universidad Nacional de Educación a Distancia.
22. COE, C. o. (2000). In: Partial Agreement in the Social and Public Health Field. Chemically Defined Flavouring Substances. Group 8.2 Aromatic Acids, No. 22. *Council of Europe Publishing, Stasbourg*, 205.
23. Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland: Boston University.

24. De Jong, W. H. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal Nanomedicine*, 133-149.
25. Eleni Pontiki, D. H.-L. (2014). Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. *molecules*, 9655-9674.
26. Erika L. Abel, J. D. (2015). Environmental Carcinogenesis. *The Molecular Basis of Cancer*, 103-128.
27. ESMO, E. S. (18 de Junio de 2016). <https://www.esmo.org/>. Obtenido de [https://www.esmo.org/](https://www.esmo.org/content/download/6628/115197/file/ES-Cancer-de-Prostata-Guia-para-Pacientes.pdf): <https://www.esmo.org/content/download/6628/115197/file/ES-Cancer-de-Prostata-Guia-para-Pacientes.pdf>
28. European Society for Medical Oncology, E. (2014). *¿Qué es el cáncer de próstata?* Obtenido de <http://www.esmo.org/Conferences/Past-Conferences/Clinical-Cancer-Prevention-2010>
29. F. Rocha Formiga, E. A.-H. (2009). *Nanosistemas a base de poliésteres*. Brazil: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra.
30. Fabienne Danhier, E. A. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 505-522.
31. Fandos, M. M. (2015). Aspectos clínico-epidemiológicos y terapéuticos del cáncer de próstata. *Acta Ortopédica Mexicana*, 375-379.
32. FDA, F. a. (s.f.). Code of Federal regulations, 21 CFR 172.515. Title 21- Food and Drugs, vol3, Chapter I- Food and Drugs Administration, Department of Health and Human Services. Part 172- Food Additives Permitted for direct Agents and Related Substances. *515-Synthetic Flavoring Substances and Adjuvants*.
33. Fernando, U. A. (2007). Cáncer de Próstata ¿Qué es el antígeno prostático específico? (La biología del PSA). *Urología Colombia*, 37-46.
34. Figueroa, M. C. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2779-2787.
35. Gleason. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Reports*, 50, 125-128.
36. GLOBOCAN, E. C. (2012). <http://www.who.int/es/>. Obtenido de <http://www.who.int/es/>: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
37. Hall, J. E. (2011). *Tratado de fisiología médica*. Barcelona : Elsevier España.
38. Hanahan, D. a. (2011). Hallmarks of Cancer. The Next Generation. *Cell*, 646-674.
39. Hans ML, L. A. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* , 319-327.
40. Hecht, S. S. (2010). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *Current Cancer Research*, volume 12, pp 53-74.
41. Heinz Lullmann, k. M. (2008). *Farmacología: texto y atlas*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana .
42. Higo, M. A. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clinical Cancer Research*, 3520-3526.
43. Hillaireau, H. a. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. . *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2873-2876.
44. Hongbin Zou, H. W. (2010). Synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationship study of novel cytotoxic aza-caffeic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6251-6359.
45. Howley, Peter M. (2015). Infectious agents and cancer. *The Molecular Basis of Cancer*, 79-102.
46. Howley, Peter M. (2015). Infectious Agents and Cancer. *The Molecular Basis of Cancer*, 79-102.
47. <http://cancerelltreatment.com/>. (07 de Junio de 2016). Obtenido de <http://cancerelltreatment.com/2015/03/14/what-is-carcinogenesis-and-cell-transformation-in-cancer/>

48. Huining He, L. S. (2015). Enzyme-triggered, cell penetrating peptide-mediate delivery of anti-tumor agents. *Journal of Controlled Release*, 1-29.
49. IMSS. (13 de febrero de 2015). <http://www.imss.gob.mx/>. Obtenido de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>
50. INEGI. (2 de febrero de 2016). <http://www.inegi.org.mx/>. Obtenido de <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=274>
51. Irina Fridlyanskaya, L. A. (2015). Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Experimental Gerontology*, 4.
52. J.A. Swanson, S. Y. (2016). Macropinocytosis. *Encyclopedia of Cell Biology*, 758–765.
53. Jena, M. M. (2013). Nanotechnology- future. *Int J Basic Clin Pharmacol*, 353-359.
54. Juana Benedí, M. Á. (2006). Fármacos Antineoplásicos . *Farmacia Profesional*, 60-64.
55. Kachapi, D. D. (2015). Application of Nonlinear Systems in Nanomechanics and Nanofluids. *Elsevier*, 1-4.
56. Kerr, J. W. (1972). Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
57. Koolman, J., & klaus-Heinrich, R. (2004). *Bioquímica: texto y atlas*. Madrid: Editorial Medica Panamericana.
58. Kreuter, J. (2007). Nanoparticles a historical perspective. *Internacional Journal of pharmacology*, 1-10.
59. L Galluzzi, M. M. (2007). Cell death modalities: classification and. *Nature*, 14, 1237- 1266.
60. Laurent S, F. D. (2010). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 2574.
61. Leal, D. P. (2001). *Bioquímica estructural y aplicada a la medicina*. México: Intituto Politécnico Nacional.
62. Lei Liu, W. R. (1995). Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention. *International Journal of Cancer*, volume 62, 345-350.
63. Longmire, M. e. (2008). Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine*, 3, 703–717.
64. Lowe, J. E. (2015). Cellular senescence. *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, 229–238.
65. Luis Carlos Sánchez-Martínez, C. A.-S.-O.-R. (2013). Prostate-specific antigen. The role in the prostate cancer diagnosis. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 124-126.
66. Luisa Fernanda Zúñiga Cerón, S. I. (2014). Adhesión celular: el ensamblaje de la vía al cáncer. *Morfología*, 3-19.
67. Lüllmann , H., Mohr, K., & Lutz , H. (2010). *Farmacología: texto y atlas*. España: Editorial Medica Panamericana.
68. Lutz F. Tietze, U. B. (1991). The Knoevenagel Reaction. *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 341–394.
69. MargaretM.McGee. (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of Inflammation* , 1-13.
70. Martinez Soriano, P., Macias Perez, J. R., Velazquez, A. M., Camacho-Enriquez, B. d., Pretelin-Castillo, G., Ruiz Sanchez, M. B., . . . Angeles, E. (2015). Solvent-Free Synthesis of Carboxylic Acids and Amide Analogs of CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester) under Infrared Irradiation Conditions. *Green and Sustainable Chemistry*, 5, 81-91.
71. Masyelly Rojas, S. S. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela*, 92-106.
72. Medicine, U. N. (22 de Junio de 2016). *Genetics Home reference*. Obtenido de Genetics Home reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/cell>

73. Merino, L. M. (2013). *Producción de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácidos cinámico y p-metoxicinámico*. Madrid: Tesis Doctoral.
74. Michel Latarjet, A. R. (2008). *Anatomía Humana* (4° edición ed.). China: Médica Panamericana.
75. Mizushima N, K. M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147:728-741.
76. Morgan. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: Oxford University Press, 456-464.
77. Moya, F. B. (2011). Planteamientos básicos del cáncer hereditario: principales síndromes. *ADEMÁS Comunicación Gráfica, s.l.*
78. Mukherjee, S. G. (1997). Endocytosis. *Physiological Reviews*, 77:759-803.
79. Muñoz, E. G. (2007). Papel de las caveolas/caveolina-1 en la fisiología del adipocito. Barcelona: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.
80. Nicholas G. Zaorsky, M. E. (2016). Brachytherapy for Prostate cancer: An Overview. *Elsevier*, 399-411.
81. Ohsumi, H. N. (2014). Autophagy: Close Contact keeps Out the Uninvited. *Current Biology*, 1-3.
82. Pájaro Castro, N., Olivero Verbel, J., & Redondo Padilla, J. (2013). Nanotecnología aplicada a la medicina. *Revista Científica Guillermo de Ockham*, 125-133.
83. Panagi Z, B. A. (2001). Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Journal of Pharmacology*, 221:143-152.
84. Pour, A. U. (2001). Cell lines. *Elsevier*, volume 1, pp 310-311.
85. Prokop, J. D. (2008). Nanovehicular intracellular delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3518-3590.
86. Quintanar-Guerrero, D., & Eric Allemann, H. F. (1998). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 11 13-1 128.
87. Randy V Hersek, M. F. (2007). Modern brachytherapy of treatment of Prostate Cancer. *Cancer Control*, 238-243.
88. Reitas, R. A. (1999). Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities. *Austin: Landes Bioscience*.
89. Rejman, J. O. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveola-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377:159-169.
90. Romieu, I. (2015). European Code against Cancer 4th Edition: Alcohol drinking and cancer. *Cancer Epidemiology*, 67-74.
91. Romieu, I. (2015). European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiology*, 56-66.
92. Rosenberg, D. H. (24 de Septiembre de 2016). *La glándula prostática está formada en su mayor parte por células secretoras, de las que derivan los adenocarcinomas, que son los tumores más frecuentes de este órgano. Dichas células secretan fosfatasa ácida y poseen antígeno prostático específico, utili.* Obtenido de http://publicacionesmedicina.uc.cl/AnatomiaPatologica/05Genital_masc/5prostata.html
93. Roser, M. F. (1998). Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46: 255-263.
94. Ruben Vardanyan, V. H. (2016). Antineoplastic Agents. *Synthesis of Best-Seller Drugs*, 495-547.
95. Saltzman, A. C. (1953). Cinnamic acid as a test substance in the evaluation of liver function. *Journal of Clinical Investigation*, 711-719.
96. Salvatore Genovese, J. E. (2010). A natural propenoic acid derivative activates peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ). *Life Sciences*, 493-498.
97. Scitable. (22 de Junio de 2016). *Nature*. Obtenido de Nature: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/what-is-a-cell-14023083>

98. Serap, D., & Zeynep Akdeste, M. E. (2015). Preparation, characterization and immunological evaluation: canine parvovirus synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles. *Journal Of Biomedical Science*, 1-12. doi:10.1186/s12929-015-0195-2
99. Shieh, M. C. (2015). *Guide to Reseach Techniques in Neuroscience*. Unites States of America: Academic Press.
100. Shive, M. S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. . *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5-24.
101. Sirichai Adisakwattana, W. S.-a. (2012). Cinnamic Acid and Its Derivatives Inhibit Fructose-Mediated Protein Glycation . *International Journal of Molecular Science*, 1778-1789.
102. Snapper, I. Y. (1940). Cinnamic acid metabolism in man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 30-34.
103. Society, A. C. (18 de Junio de 2016). <http://www.cancer.org>. Obtenido de <http://www.cancer.org>: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002319-pdf.pdf>
104. Song, X. Z. (2008). PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and. *International Journal of Pharmacology*, 320-329.
105. SSA. (2015). *Base de Egresos Hospitalarios 2013*. México: Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI.
106. SSA, S. d. (2001). Programa de Acción: Cáncer de Prostata. Mexico: Secretaría de Salud .
107. Valdespino-Castillo, V. M.-G. (2011). Cancer initiation and progression: a biological system. *GAMO*, 358-365.
108. Vasir, J. K. (2007). Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 718-728.
109. Vilches, m. P. (2008). *El antecedente de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), en casos de enfermos con cáncer de próstata es mayor en relación con casos controles. Se han encontrado partículas virales en el tejido prostático maligno como el Herpes Virus 2, virus del simio (. granada: Universidad de Granada Facultad de mMedicina.*
110. Viswanathan, S. H. (2010). Nanotechnology in biomedical applications: a review. *International Journal of Nano and Biomaterials*, 119-139.
111. Wang Z, T. C. (2009). Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano*, 3:4110–6.
112. William J, L. M. (2013). Encyclopedia of biological chemistry. *Academic Press*.
113. Wride, E. J. (1995). Programmed Cell Death . *Development International Review of Cytology Volume 163*, 105-173.
114. Yang YY, C. T. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. . *biomaterials*, 22:231–241.
115. Yukihiro Akao, M. K. (2014). Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. *Phytomedicine*, 1070-1077.
116. Zeinerldin, R. (2015). Nanotechnology for cancer screening and diagnosis . *Anti-Abrasive Nanocoatings*, 81-103.

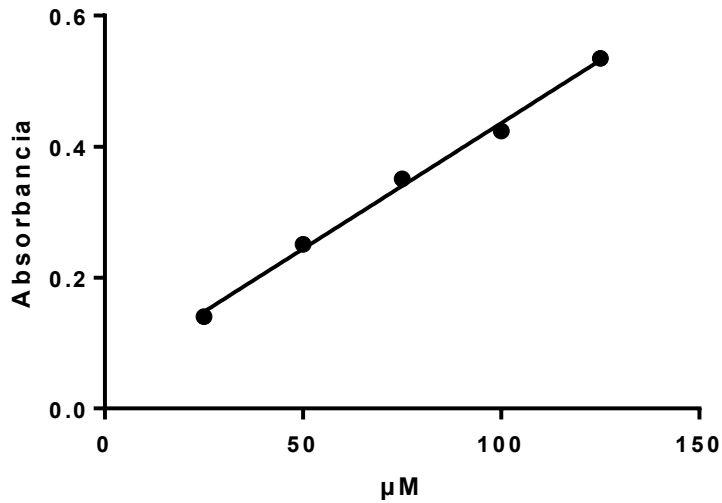
9. ANEXOS

A Anexo I. Carga de nanopartículas

Tabla 20. Curva de Calibración LQM 717

μM	Absorbancias (nm)		
25.0	0.1409	0.1401	0.1402
50.0	0.2506	0.2510	0.2507
75.0	0.3510	0.3498	0.3506
100.0	0.4228	0.4238	0.4236
125.0	0.5358	0.5348	0.5324

Curva de calibración LQM 717



Ecuación: $Y = 0.003842 * X + 0.05172$

Muestra	Absorbancia (nm)
1	0.3277
2	0.3192
3	0.3175
Promedio	0.3214

Concentración: 70.2099 μM

$$\text{Concentración de LQM no cargado} = \left(\frac{\text{concentración}}{2\text{ml}} \right) (3\text{ml})$$

Concentración de LQM no cargado = 105.3149 μM

$$\text{Concentración Final} = 1000 \mu\text{M} - \text{concentración LQM libre}$$

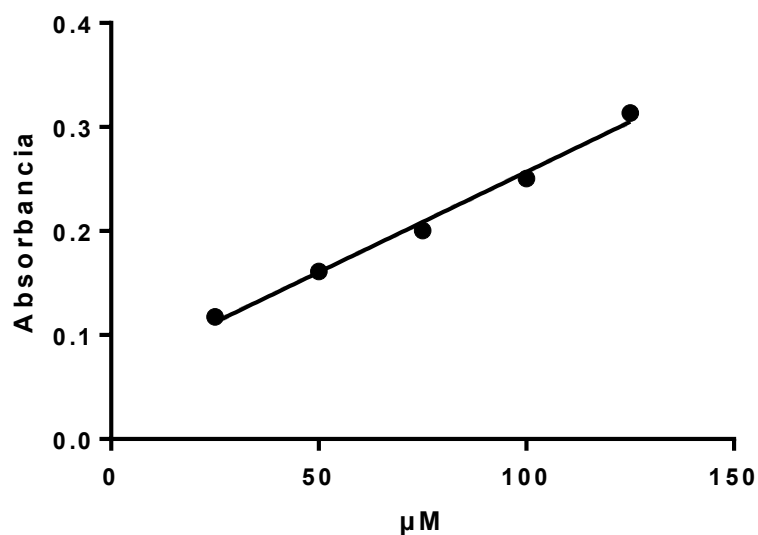
Concentración Final = 894.6850 μM

Concentración porcentual = 89.4685%

Tabla 21. Curva de Calibración LQM 731

μM	Absorbancias (nm)		
25.0	0.1209	0.1133	0.1180
50.0	0.1608	0.1617	0.1614
75.0	0.1980	0.2014	0.2022
100.0	0.2498	0.2498	0.2523
125.0	0.3083	0.3158	0.3168

Curva de calibración LQM 731



Ecuación: $Y = 0.001927 * X + 0.06416$

Muestra	Absorbancia (nm)
1	0.1992
2	0.1950
3	0.1988
Promedio	0.1976

Concentración: 70.6486 μM

$$\text{Concentración de LQM no cargado} = \left(\frac{\text{concentración}}{2\text{ml}} \right) (3\text{ml})$$

Concentración de LQM no cargado= 105.9730 μM

$$\text{Concentración Final} = 1000 \mu\text{M} - \text{concentración LQM libre}$$

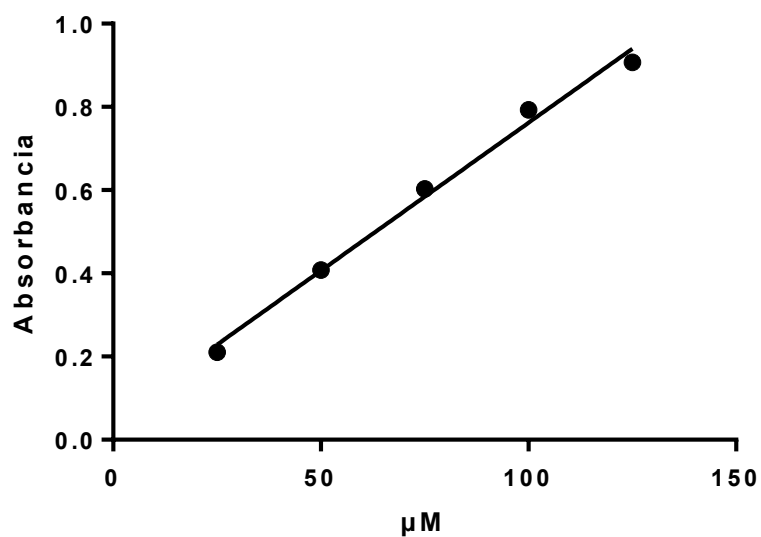
Concentración Final= 894.0269 μM

Concentración porcentual= 89.4026 %

Tabla 22. Curva de Calibración LQM 738

μM	Absorbancias		
25.0	0.2106	0.2121	0.2085
50.0	0.4050	0.4125	0.4068
75.0	0.6028	0.6029	0.6041
100.0	0.7931	0.7919	0.7929
125.0	0.9058	0.9073	0.9081

Curva de calibración LQM 738



Ecuación: $Y = 0.007111 \cdot X + 0.05093$

Muestra	Absorbancia (nm)
1	0.4198
2	0.4226
3	0.4236
Promedio	0.422

Concentración: 52.18 μM

$$\text{Concentración de LQM no cargado} = \left(\frac{\text{concentración}}{2\text{ml}} \right) (3\text{ml})$$

Concentración de LQM no cargado = 78.2738 μM

$$\text{Concentración Final} = 1000 \mu\text{M} - \text{concentración LQM libre}$$

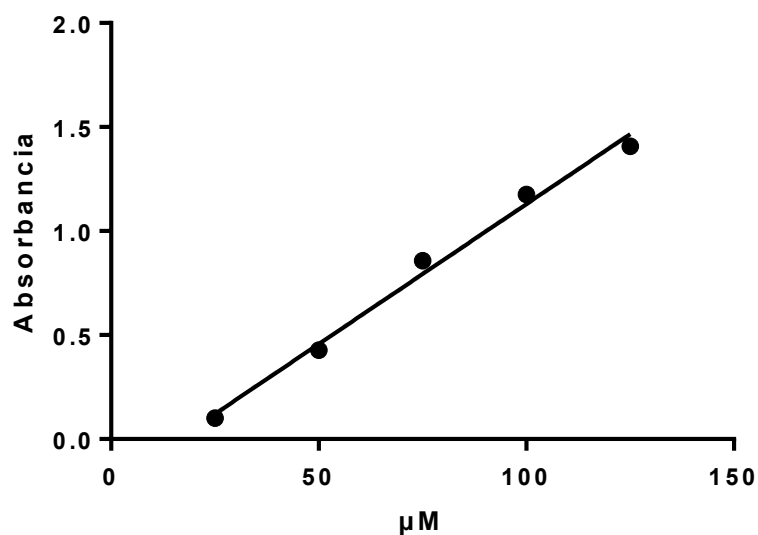
Concentración Final = 921.7261 μM

Concentración porcentual = 92.1726 %

Tabla 23. Curva de Calibración LQM 755

μM	Absorbancias (nm)		
25.0	0.1003	0.1003	0.0998
50.0	0.4275	0.4261	0.4276
75.0	0.8598	0.8580	0.8569
100.0	1.1795	1.1775	1.1703
125.0	1.4012	1.4074	1.4124

Curva de calibración LQM 755



Ecuación: $Y = 0.01345 \cdot X - 0.2151$

Muestra	Absorbancia (nm)
1	0.4468
2	0.4488
3	0.4476
Promedio	0.4477

Concentración: 49.2812 μM

$$\text{Concentración de LQM no cargado} = \left(\frac{\text{concentración}}{2\text{ml}} \right) (3\text{ml})$$

Concentración de LQM no cargado= 73.9219 μM

$$\text{Concentración Final} = 1000 \mu\text{M} - \text{concentración LQM libre}$$

Concentración Final= 926.0780 μM

Concentración porcentual=92.6078 %

B Anexo II. Análisis Estadístico de la optimización de la caracterización de las nanopartículas

R-cuadrada = 95.1424 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 92.5517 %

Error estándar del est. = 8.14867

Error absoluto medio = 5.37188

Estadístico Durbin-Watson = 2.23455 (P=0.5950)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.138173

Tabla 24. Análisis de Varianza para Tamaño de Partícula

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:PLGA+bloque	547.56	1	547.56	8.25	0.0116
B:LQM+bloque	45.1004	1	45.1004	0.68	0.4228
C:PVA+bloque	18221.6	1	18221.6	274.42	0.0000
AA	253.92	1	253.92	3.82	0.0694
AB	259.21	1	259.21	3.90	0.0669
AC	5.76	1	5.76	0.09	0.7724
BC	157.594	1	157.594	2.37	0.1442
bloques	17.5104	1	17.5104	0.26	0.6151
Error total	996.011	15	66.4007		
Total (corr.)	20504.2	23			

Tabla 25. Coeficiente de regresión para Tamaño de Partícula

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	192.692
A:PLGA	-1.857
B:LQM	-1.26633
C:PVA	21.6667
AA	0.01104
AB	0.01288
AC	-0.024
BC	0.205

C Anexo III. Análisis estadístico de la determinación de IC₅₀

Compuesto LQM 717 en línea celular HaCaT

Ecuación: Las curvas de calibración, Curva logística de cuatro parámetros

$f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{-Hillslope})$

$f = \text{if}(x \leq 0, \text{if}(Hillslope > 0, \min, \max), f1)$

R R² Adjunte de R² Error típico de estimación

0.9955 0.9911 0.9642 4.9271

	Coefficiente	error estándar	t	P
min	37.3964	3.6456	10.2579	0.0619
max	98.7176	7.7524	12.7338	0.0499
EC50	21.4436	1.6282	13.1701	0.0482
Hillslope	-5.7423	2.3991	-2.3935	0.2519

Análisis de varianza:

Análisis de varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	4	21419.4842	5354.8711
Residual	1	24.2759	24.2759
Total	5	21443.7601	4288.7520

Corregido para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	3	2689.1507	896.3836	36.9249	0.1203
Residual	1	24.2759	24.2759		
Total	4	2713.4265	678.3566		

Pruebas Estadísticas:

Prueba de normalidad(Shapiro-Wilk)

Estadística W= 0.9464 Nivel significativo= 0.0500

Compuesto LQM 717 en línea celular PC-3

Ecuación: Las curvas de calibración, Curva logística de cuatro parámetros

$f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{-Hillslope})$

f = if(x<=0, if(Hillslope>0,min,max), f1)

R R2 Adjunte de R2 Error típico de estimación

1.0000 1.0000 1.0000 0.1725

	Coefficiente error estándar	t	P	
min	27.3099	0.4868	56.1013	0.0113
max	100.4128	0.1288	779.8881	0.0008
EC50	18.6916	0.0704	265.6534	0.0024
Hillslope	5.2676	0.0852	61.8573	0.0103

Análisis de varianza:

Análisis de varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	4	33076.1189	8269.0297
Residual	1	0.0298	0.0298
Total	5	33076.1487	6615.2297

Corregido para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	3	3100.9372	1033.6457	34722.4562	0.0039
Residual	1	0.0298	0.0298		
Total	4	3100.9670	775.2418		

Pruebas Estadísticas:

Prueba de normalidad(Shapiro-Wilk)

Estadística W= 0.9386 Nivel significativo= 0.0500

Compuestos LQM 731 en línea celular HaCaT

Ecuación: Las curvas de calibración, Curva logística de cuatro parámetros

f1 = min + (max-min)/(1 + (x/EC50)^(-Hillslope))

f = if(x<=0, if(Hillslope>0,min,max), f1)

R R² Adjunte de R² Error típico de estimación

0.9990 0.9981 0.9923 2.9265

	Coficiente	error estándar	t	P
min	26.4027	2.1481	12.2912	0.0517
max	100.8866	3.8344	26.3106	0.0242
EC50	23.1982	0.7268	31.9197	0.0199
Hillslope	-6.2999	1.3145	-4.7925	0.1310

Análisis de varianza:

Análisis de varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	4	21635.5225	5408.8806
Residual	1	8.5643	8.5643
Total	5	21644.0868	4328.8174

Corregido para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	3	4433.6768	1477.8923	172.5634	0.0559
Residual	1	8.5643	8.5643		
Total	4	4442.2411	1110.5603		

Pruebas Estadísticas:

Prueba de normalidad(Shapiro-Wilk)

Estadística W= 0.9489 Nivel significativo= 0.0500

Compuestos LQM 731 en línea celular PC-3

Ecuación: Las curvas de calibración, Curva logística de cuatro parámetros

$$f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{-Hillslope})$$

$$f = \text{if}(x \leq 0, \text{if}(Hillslope > 0, \min, \max), f1)$$

R R² Adjunte de R² Error típico de estimación

0.9977 0.9955 0.9820 3.5703

	Coeficiente error estándar		t	P
min	15.6542	2.5316	6.1835	0.1021
max	74.7311	3.9241	19.0443	0.0334
EC50	20.2484	0.7146	28.3366	0.0225
Hillslope	-9.3507	2.5199	-3.7107	0.1676

Análisis de varianza:

Análisis de varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	4	9569.4378	2392.3594
Residual	1	12.7472	12.7472
Total	5	9582.1850	1916.4370

Corregido para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	3	2823.0550	941.0183	73.8214	0.0853
Residual	1	12.7472	12.7472		
Total	4	2835.8022	708.9506		

Pruebas Estadísticas:

Prueba de normalidad(Shapiro-Wilk)

Estadística W= 0.8865 Nivel significativo= 0.0500

Compuestos LQM 755 en línea celular PC-3

Ecuación: Las curvas de calibración, Curva logística de cuatro parámetros

$$f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{-Hillslope})$$

$$f = \text{if}(x \leq 0, \text{if}(Hillslope > 0, \min, \max), f1)$$

R R² Adjunte de R² Error típico de estimación

0.9999 0.9998 0.9991 0.5063

	Coeficiente error estándar		t	P
min	6.0374	2.5461	2.3712	0.2541
max	101.0794	24.6232	4.1050	0.1521
EC50	12.8081	4.4890	2.8532	0.2146
Hillslope	-1.3296	0.2733	-4.8655	0.1290

Análisis de varianza:

Análisis de varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	4	6349.5764	1587.3941
Residual	1	0.2563	0.2563
Total	5	6349.8327	1269.9665

Corregido para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	3	1161.9240	387.3080	1511.0173	0.0189
Residual	1	0.2563	0.2563		
Total	4	1162.1803	290.5451		

Pruebas Estadísticas:

Prueba de normalidad(Shapiro-Wilk)

Estadística W= 0.9559 Nivel significativo= 0.0500