



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

” Estudio del efecto antioxidante de nanopartículas de Quitosán-Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar, expuestos a peróxido de hidrógeno como generador de daño oxidativo.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

PRESENTA:

ANA PAULA RODRÍGUEZ ORTÍZ

ASESOR:

DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

Coasesor:

M. en C. Omar Rodrigo Guadarrama Escobar

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021



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
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Estudio del efecto antioxidante de nanopartículas de Quitosán-Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar, expuestos a peróxido de hidrógeno como generador de daño oxidativo.

Que presenta la pasante: **Ana Paula Rodríguez Ortiz.**

Con número de cuenta: **415116800** para obtener el Título de: **Licenciada en Farmacia.**

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 25 de mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	
VOCAL	Dr. Roberto Díaz Torres	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Álvarez Ávila	
2do. SUPLENTE	M.C. Sofía Piña Olmos	

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

LMCF/cnn*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

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 Titulación
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**

Estudio del efecto antioxidante de nanopartículas de Quitosán-Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar, expuestos a peróxido de hidrógeno como generador de daño oxidativo.

Que presenta la pasante: **Ana Paula Rodríguez Ortiz.**

Con número de cuenta: **415116800** para obtener el Título de: **Licenciada en Farmacia.**

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 25 de mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	
VOCAL	Dr. Roberto Díaz Torres	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Álvarez Ávila	
2do. SUPLENTE	M.C. Sofía Piña Olmos	

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Estudio del efecto antioxidante de nanopartículas de Quitosán-Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar, expuestos a peróxido de hidrógeno como generador de daño oxidativo.

Que presenta la pasante: **Ana Paula Rodríguez Ortiz.**

Con número de cuenta: **415116800** para obtener el Título de: **Licenciada en Farmacia.**

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 25 de mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	_____
VOCAL	Dr. Roberto Díaz Torres	_____
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Álvarez Ávila	_____
2do. SUPLENTE	M.C. Sofía Piña Olmos	_____

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

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 Titulación
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

Estudio del efecto antioxidante de nanopartículas de Quitosán-Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar, expuestos a peróxido de hidrógeno como generador de daño oxidativo.

Que presenta la pasante: **Ana Paula Rodríguez Ortiz.**

Con número de cuenta: **415116800** para obtener el Título de: **Licenciada en Farmacia.**

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 25 de mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	_____
VOCAL	Dr. Roberto Díaz Torres	_____
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	_____
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Álvarez Ávila	_____
2do. SUPLENTE	M.C. Sofía Piña Olmos	_____

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

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 Titulación
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**

Estudio del efecto antioxidante de nanopartículas de Quitosán-Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar, expuestos a peróxido de hidrógeno como generador de daño oxidativo.

Que presenta la pasante: **Ana Paula Rodríguez Ortiz.**

Con número de cuenta: **415116800** para obtener el Título de: **Licenciada en Farmacia.**

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 25 de mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	_____
VOCAL	Dr. Roberto Díaz Torres	_____
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	_____
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Álvarez Ávila	_____
2do. SUPLENTE	M.C. Sofía Piña Olmos	_____

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

Agradecimientos

A mi familia, les quiero agradecer a mis papás y a mi hermana por todo el apoyo que me brindaron durante mis estudios, cada uno en su forma particular, a mi pequeño acompañante de tareas y desvelos, Suri, que siempre estuvo a mi lado aunque fuera dormido.

A mi asesor el Dr. Roberto Díaz Torres, así como a la Dra. Patricia Ramírez Noguera que me permitieron quedarme a realizar este proyecto y por transmitirme conocimientos nuevos. A todos los del laboratorio 9 de la UIM que me ayudaron de diferentes maneras.

A mis amigos, todos ellos a los que conocí en diferentes circunstancias, momentos, o maneras pero que siempre me hicieron pasarla bien. A Tinoco por su ayuda, consejos e impulsarme a realizar esta tesis.

Y finalizando con la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarme una buena educación, por hacer que me esforzara para entrar, para mantenerme y para salir.



Dedicatoria

A todas las ratas, ratones y animales de laboratorio que dieron su vida para ayudar a mi formación profesional. Especialmente a las que contribuyeron al proceso de este trabajo.

A Nino, que me vio crecer y esforzarme por entrar, pero no pudo verme salir.



Índice

Abreviaturas	11
Índice de gráficas.....	13
Índice de figuras	14
Índice de tablas	15
1. Introducción	16
2. Marco teórico	18
2.1 Enfermedades cardiacas	18
2.1.1 El estrés oxidativo y su relación con enfermedades cardiovasculares	19
2.1.1.1Cardiopatía isquémica e infarto agudo de miocardio	19
2.2 Radicales libres	21
2.2.1 Especies reactivas de oxígeno	21
2.3 Sistemas de defensa antioxidante.....	22
2.4 Tratamientos.....	23
2.5 Tratamientos no convencionales.....	24
2.5.1Nanomedicina	24
2.5.2 Ozonoterapia.....	24
2.5.3 Dispositivos.....	25
2.6 Nanotecnología	25
2.6.1 Nanopartículas.....	26
2.6.1.1 Definición.....	26
2.6.1.2 Tipos de nanopartículas.....	26
2.6.1.3 Materiales utilizados en la nanoencapsulación de fármacos	27
2.6.1.4 Métodos de preparación.....	28
2.6.1.4.1Polimerización.....	29
2.6.1.4.2 Emulsión/evaporación	29
2.6.1.4.3 Difusión de emulsificación	29
2.6.1.4.4 Nanoprecipitación:	30
2.6.1.4.5 Doble o múltiple emulsión	30
2.6.1.4.5 Método de “Salting-out”	30
2.6.1.4. 6 Gelificación ionica.....	31
2.6.1.5 Caracterización	32
2.6.1.5.1 Tamaño y morfología.....	32
2.6.1.5.2Potencial Zeta.....	34






































































2.6.1.5.3 Eficiencia de encapsulación	34
2.6.1.2 Nanopartículas de quitosán-GSH.....	34
2.7 Cultivos celulares	35
2.7.1 Tipos de cultivo celular	36
2.7.1.1 Cultivo de órganos	36
2.7.1.2 Explantes primarios.....	36
2.7.2 Aplicaciones del cultivo celular	39
2.7.3 Ventajas y limitaciones	41
3. Planteamiento del problema	42
4. Hipótesis	42
5. Objetivos	42
5.1 Objetivo general	42
6. Materiales y métodos	43
6.1 Reactivos y soluciones	43
6.1.1 Cultivo organotípico	43
6.1.2 Nanopartículas.....	43
6.1.4 Determinación de proteínas.....	44
6.1.5 Cuantificación de lipoperoxidación (TBARS)	44
6.2 Aparatos y Equipos.....	44
6.3. Metodología	45
6.3.1 Sistema de nanopartículas	45
6.3.2 Porcentaje de encapsulamiento	46
6.3.3 Cultivos organotípicos	47
6.3.3.1 Viabilidad.....	47
6.3.3.2 Cultivos organotípicos expuestos con H ₂ O ₂	47
6.3.3.3 Exposición a nanopartículas	48
6.3.4 Cuantificación de GSH en cultivos organotípicos.	48
6.3.5 Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	49
6.3.6 Cuantificación de lipoperoxidación (TBARS)	49
7. Resultados y Análisis.....	50
7.1 Caracterización de nanopartículas.....	50
7.2 Viabilidad.....	52
7.3 Cuantificación de GSH en cultivos organotípicos	57
7.4 Cuantificación de TBARS en cultivos organotípicos.....	59
8. Conclusiones.....	61
9. Perspectivas.....	61
10. Referencias.....	62









11. Anexos	74
11.1 Anexo 1: Información teórica complementaria	74
11.1.1 Reacción del ensayo de TBARS	74

Abreviaturas
















-  μm : Micrómetros
-  BET: Método desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller
-  Q CB: Quitosán concentración baja
-  Q CA: Quitosán concentración alta
-  Q-GSH CB: Quitosán con glutatión concentración baja
-  Q-GSH CA: Quitosán con glutatión concentración alta
-  AAS: Ácido acetilsalicílico
-  ADN: Ácido desoxirribonucleico
-  ADP: Adenosín difosfato
-  AFM: Microscopio de fuerza atómica
-  AMP: Adenosín monofosfato
-  ARA2: Antagonistas del receptor de angiotensina 2
-  ATP: Adenosín trifosfato
-  CA: Concentración alta
-  CaCl_2 : Cloruro de calcio
-  CB: Concentración baja
-  CBBG: Coomassie brillante G250
-  CDI: Desfibrilador cardioversor implantable
-  COX: Ciclooxygenasa
-  CTE_m: Cadena de transporte de electrones mitocondrial
-  DMSO: Dimetilsulfóxido
-  DTNB: Dítio bis (Reactivo de Ellman)
-  ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles
-  ECV: Enfermedades cardiovasculares
-  EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
-  EO: Estrés oxidativo
-  ERN: Especies reactivas de nitrógeno
-  ERO: Especies reactivas de oxígeno
-  GPx: Glutatión peroxidasa
-  GSH: Glutatión reducido
-  GSSG: Glutatión en su forma oxidada
-  H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno
-  H-NMR: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón
-  I/R: Isquemia reperfusión

-
-  IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
 -  IMA: Infarto agudo de miocardio
 -  KCl: Cloruro de potasio
 -  KH_2PO_4 : Fosfato monopotásico
 -  KH_2PO_4 : Fosfato de potasio
 -  LD: Laser Diffraction (Difracción laser)
 -  LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)
 -  MDA: Malondialdehído
 -  MgCl_2 : Cloruro de magnesio
 -  MgSO_4 : Sulfato de magnesio
 -  Na_2HPO_4 : Fosfato de disódio
 -  NaCl: Cloruro de sodio
 -  NAD^+ : Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)
 -  NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
 -  NaHCO_3 : Bicarbonato de sodio
 -  nm: nanómetros
 -  Np: Nanopartículas
 -  O_2^- : Radical sSuperóxido
 -  OH: Radical hHidroxilo
 -  OMS: Organización Mmundial de la Ssalud
 -  PA: Principio activo
 -  PBS: Buffer salino de fosfatos
 -  PCS: Photon Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlación de fotones)
 -  PLA: Polilactic Acid (Ácido poliláctico)
 -  PLGA: poli(ácido láctico)-coglicólico
 -  Q: Quitosán
 -  Q-GSH: Quitosán- Glutatión reducido
 -  SEM: Microscopia electrónica de barrido
 -  ESEM: Scanning electron microscopy (Microscopia electrónica de barrido)
 -  SOD: Superóxido dismutasa
 -  TEM: Transmission Electron Microscopy (Microscopia electrónica de transmisión)
 -  TPP: Tripolifosfato
 -  XPS: X-Ray Photon Spectroscopy (Espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos x)













Índice de gráficas

	Gráfica 1. Distribución de tamaño de los diferentes grupos de nanopartículas. A) NP-Q GSH. B) NP - Q.....	50
	Gráfica 2. Comparación de porcentaje de viabilidad de tejidos de corazón incubados a diferentes tiempos..	52
	Gráfica 3 Comparación de porcentaje de viabilidad de cultivos de tejidos de corazón expuestos a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	53
	Gráfica 4 Comparación de porcentaje de viabilidad de cultivos de tejidos de corazón expuestos a una concentración de H ₂ O ₂ por diferentes tiempos.....	54
	Gráfica 5 Comparación del porcentaje de viabilidad de cultivos de tejido de corazón expuestos a diferentes concentraciones de NP de quitosán y quitosán/GSH. . .	55
	Gráfica 1 Comparación de la concentración de GSH en cultivos de tejidos de corazón expuestos a diferentes tratamientos,.....	46
	Gráfica 7 Comparación de la concentración de MDA en cultivos de tejidos de corazón expuestos a diferentes tratamientos.....	59

Índice de figuras

	Figura 1. Representación esquemática del catabolismo del adenosintrifosfato (ATP) durante la fase de isquemia y de la producción de especies reactivas de oxígeno por el sistema xantina-oxidasa en la fase precoz de la reperfusión. (Grande, L. 2006) 20
	Figura 2 Cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial, que constituye la vía de formación de radicales libres derivados del oxígeno. (Ceballos,G. 2010). 22
	Figura 3. Metabolismo básico del GSH (Sarrasague, M. 2006) 23
	Figura 4. Escala nanométrica que muestra el tamaño de las nanopartículas mediante comparaciones. . (Prior, A. 2018) 25
	Figura 5 Representación esquemática de las estructuras resultantes de un proceso de micro o nanoencapsulación. (Cortez, P. 2015)..... 27
	Figura 6 Método de Emulsión/ evaporación..... 29
	Figura 7 Método de difusión de emulsificación..... 30
	Figura 8. Método de nanoprecipitación..... 30
	Figura 9. Método de “salting out” 31
	Figura 10 Método de gelificación iónica. 32
	Figura 11 Estructura química del quitosán en proyección de Haworth. (Contreras 2015) 35
	Figura 12. Representación esquemática de cultivo de órganos 36
	Figura 13. Representación esquemática de cultivo de explantes 37
	Figura 14 Representación esquemática de cultivo celular primario..... 38
	Figura 15 Representación esquemática de cultivo organotípico 39
	Figura 16. Reacción de óxido-reducción de GSH..... 58

Índice de tablas

	Tabla 1. Principales enfermedades cardiovasculares.....	18
	Tabla 2. Principales oxidantes, prooxidantes y antioxidantes en las células de los mamíferos (Cárdenas, N. 2008).	22
	Tabla 3. Tratamiento farmacológico en cardiopatía isquémica	24
	Tabla 4 . Materiales utilizados en micro y nanoencapsulación de fármacos.....	28
	Tabla 5. Diferentes técnicas empleadas en la caracterización de sistemas nanoparticulados.	32
	Tabla 6 . Diferentes técnicas empleadas en el análisis del tamaño de partículas.	33
	Tabla 7. Ventajas y limitaciones de cultivo organotípico (Onscience 2018).....	38
	Tabla 8. Principales ventajas y desventajas de la utilización de la técnica de cultivos (García, JM. 2002).....	41
	Tabla 9. Volúmenes requeridos de GSH y PBS para la preparación de la curva estándar de GSH.....	46
	Tabla 10. Concentraciones de H ₂ O ₂ agregadas a los cultivos organotípicos	47
	Tabla 11. Concentraciones de nanopartículas adicionadas a los cultivos organotípicos.....	48
	Tabla 12. Resultados obtenidos de la caracterización de las nanopartículas,.....	50

1. Introducción

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) constituyen la primera causa de muerte en todo el mundo y contribuyen con el 60 % de la mortalidad general (31.7 millones de fallecidos) según publicaciones de la OMS. Entre las ECNT, las enfermedades cardiovasculares (ECV), específicamente las del corazón, son las de mayor incidencia (OMS. 2018). Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se estima que en los próximos 10 años, cerca de un millón de personas morirán a causa de ECV en América Latina y el Caribe; aproximadamente el 23,0 % de estas serán menores de 60 años (Delgado, R. 2009).

Dentro de las principales enfermedades cardiovasculares se encuentra la cardiopatía isquémica, el cual es un trastorno en donde parte del miocardio recibe una cantidad insuficiente de sangre y oxígeno; surge de manera específica cuando hay un desequilibrio entre el aporte de oxígeno y la necesidad de éste por dicha capa muscular. La causa más frecuente de isquemia del miocardio es el ataque aterosclerótico de una arteria epicárdica coronaria (o arterias) que baste para disminuir la circulación sanguínea al miocardio en una región y una perfusión insuficiente de esa capa por parte de la arteria coronaria afectada (Antman, E. 2019).

La cardiopatía isquémica, y el infarto agudo de miocardio (IMA), así como el fenómeno isquemia-reperusión, constituyen procesos fisiopatológicos en los que los radicales libres se encuentran involucrados. Conceptualmente, el IMA se designa como la necrosis miocárdica aguda de origen isquémico, secundaria, generalmente, a la oclusión trombótica de una arteria coronaria. No solo es una enfermedad frecuente, sino altamente letal, cuya mortalidad durante la fase aguda se ha estimado entre el 20 y el 50 %. (Delgado, E. 2002).

Existe una serie de evidencias que implican a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y al estrés oxidativo (EO) en el daño celular que se produce durante un episodio de isquemia reperusión (I/R). Dada la gran variedad y complejidad de procesos mediados por estos agentes oxidantes, se hace difícil definir un mecanismo principal que explique su asociación con este tipo de daño celular. Se sabe, en cambio, que pueden afectar biomoléculas esenciales, como lípidos, proteínas y el ADN. Como tratamiento a este padecimiento se utilizan terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas en antioxidantes, ya que parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un aumento del EO. Uno de estos antioxidantes es el glutatión, el cual es muy popular por su capacidad para minimizar el estrés oxidativo y los efectos negativos descendentes que se cree están asociados con el estrés oxidativo. El glutatión es ampliamente conocido por minimizar la peroxidación lipídica de las membranas celulares y otros daños que se sabe que ocurren con el estrés oxidativo (Delgado, L. 2010).

Actualmente la aplicación de la nanotecnología es una gran promesa para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Se están desarrollando nanodispositivos para la liberación dirigida y controlada de medicamentos en sitios específicos en el organismo, por ejemplo, en células, tejidos, vasos sanguíneos y el corazón, así como para el diagnóstico, detección temprana de enfermedades cardiovasculares y tratamiento individualizado de pacientes (Vélez, J. 2016).

La importancia de la nanotecnología farmacéutica para la terapia con fármacos reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de bajo peso molecular, así como macromoléculas como los péptidos, proteínas y genes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés (Villafuerte, L. 2009).

Considerando las propiedades que posee el glutatión reducido como antioxidante para eliminar las especies reactivas de oxígeno, se ha considerado su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo, como es el caso de la cardiopatía isquémica.



2. Marco teórico

2.1 Enfermedades cardiacas

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Las principales enfermedades cardiovasculares se incluyen en la tabla 1:

Tabla 1. Principales enfermedades cardiovasculares

Enfermedad	Características	Factores de riesgo
Cardiopatía isquémica <ul style="list-style-type: none"> 🌿 Infarto agudo de miocardio. 🌿 Angina de pecho estable. 🌿 Angina de pecho inestable. 	Enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardiaco.	<ul style="list-style-type: none"> 🌿 Hipertensión arterial 🌿 Tabaquismo 🌿 Niveles elevados de colesterol 🌿 Diabetes 🌿 Sedentarismo 🌿 Edad 🌿 Sexo masculino
Enfermedades cerebrovasculares	Enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro	<ul style="list-style-type: none"> 🌿 Sobrepeso u obesidad 🌿 Sedentarismo 🌿 Consumo de alcohol muy elevado 🌿 Diabetes 🌿 Tabaquismo
Arteriopatías periféricas	Enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores;	<ul style="list-style-type: none"> 🌿 Tabaquismo 🌿 Diabetes 🌿 Obesidad 🌿 Presión arterial alta 🌿 Colesterol alto 🌿 Edad avanzada
Aterosclerosis	Enfermedad sistémica inflamatoria, crónica y progresiva que se inicia por la disfunción endotelial y posteriormente se amplifica por el estrés oxidativo, el depósito de lípidos y el reclutamiento de monocitos	
Cardiopatía reumática	Lesiones del músculo cardiaco y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos	
Cardiopatías congénitas	Malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento;	

Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares	Coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.	
--	---	--

2.1.1 El estrés oxidativo y su relación con enfermedades cardiovasculares

Gracias a la experiencia clínica y estudios prospectivos realizados se ha podido, establecer una asociación entre el estrés oxidativo (EO) y las enfermedades cardiovasculares (ECV), se plantea que este es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial y de la subsecuente ECV.

El EO consiste en un desbalance a corto o largo plazo del equilibrio antioxidantes/pro-oxidantes, que provoca una disrupción de los mecanismos de señalización y control celular, a causa de favorecer los procesos de pro-oxidación u obstaculizar los mecanismos antioxidantes (Delgado, L.2009).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEm) constituye la fuente primaria de obtención de energía en las células cardíacas. A través de ésta se producen una serie de procesos de óxido-reducción y con ello se generan especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, con la consecuente afectación en sus estructuras y funciones. (Delgado, L. 2009)

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas en múltiples enfermedades y causan daño directo o indirecto en diferentes órganos. En el paciente con estado crítico que se encuentra ingresado en terapia se observa un conjunto de afecciones donde están implicadas las ERO, entre las que se encuentran: cardiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio, angina inestable, insuficiencia cardíaca, arritmias posreperfusión, enfermedad cerebrovascular, e hipertensión arterial (Vida, P. 2017)

2.1.1.1 Cardiopatía isquémica e infarto agudo de miocardio

La cardiopatía isquémica y el infarto agudo de miocardio es la manifestación de un proceso que comienza con un exceso de radicales libres, los cuales inician el evento aterosclerótico cuando un radical libre sustrae en el lumen vascular un electrón a la grasa poli-insaturada del colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad); éste se oxida y da comienzo a la formación de la placa aterosclerótica y la disfunción del endotelio vascular, el cual permite el paso del LDL oxidado al espacio subendotelial. El endotelio dañado origina fácilmente nuevos radicales libres que van acumulando las llamadas moléculas de adhesión. Seguido a este suceso el monocito se adhiere al endotelio, se transforma en monocito macrófago que reesterifica las LDL por medio de la enzima colesterol aciltransferasa, para así transformarse en célula espumosa cargada de grasa; estas células estallan y con ello se inicia el núcleo lipídico de la placa. (Maldonado, O. 2010)

Factores humorales y hemodinámicos llevan a la fractura de la placa aterogénica; si la placa se desprende puede formar un trombo. Si el trombo causa una completa obstrucción de alguna arteria del corazón causa una isquemia, ocasionando una falta completa de oxígeno (hipoxia), la cual conlleva a una necrosis y daño al tejido. Este

daño involucra a una cascada de eventos, como desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, alteración de la homeostasis iónica y generación de radicales libres derivados del oxígeno. (Maldonado, O. 2010)

Durante normoxia, la enzima xantina deshidrogenasa cataliza la resíntesis de ATP a través de un proceso anabólico de fosforilación oxidativa. Esta reacción consume iones hidrógeno por conversión de hipoxantina más NAD^+ a xantina y NADH , el NAD^+ es reducido en la conversión. Durante la isquemia, la xantina deshidrogenasa es convertida a xantina oxidasa por proteasas activadas por calcio. Los iones hidrógeno son acumulados y el ATP es degradado a ADP, AMP, adenosina, inosina, y eventualmente a hipoxantina. La hipoxantina es activada por la xantina oxidasa más que por la xantina deshidrogenada a formar xantina, y la xantina es irreversiblemente convertida a urato. Durante el proceso, el oxígeno es transformado en superóxido y peróxido de hidrógeno. El peróxido más el superóxido interactúan para formar la más reactiva especie de oxígeno, los radicales hidroxilos (Figura 1) (Cárdenas, N. 2008).

Esos radicales libres de oxígeno son capaces de producir daño celular, peroxidación lipídica de las membranas y degradación de ácidos nucleicos. En estudios realizados sobre el efecto de la peroxidación lipídica, se encontró que los niveles bajos de antioxidantes y la peroxidación lipídica están involucrados en las fases tempranas del proceso aterosclerótico, que finalmente concluye en infarto de miocardio (Maldonado, O. 2010; Cárdenas, N. 2008).

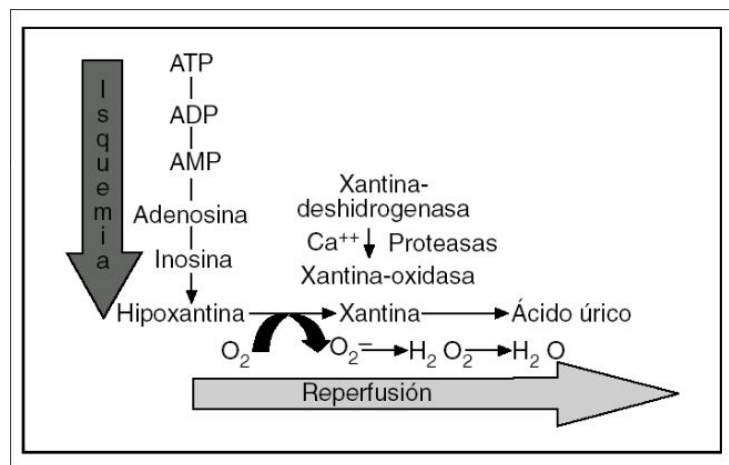


Figura 1. Representación esquemática del catabolismo del adenosintrifosfato (ATP) durante la fase de isquemia y de la producción de especies reactivas de oxígeno por el sistema xantina-oxidasa en la fase precoz de la reperfusión. (Grande, L. 2006)

2.2 Radicales libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica.

Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos. Como producto de nuestro metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, tales como: Especies Reactivas de Oxígeno (ERO: el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo, el radical hidroxilo) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito), entre otros, cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico. (Maldonado, O. 2010)

2.2.1 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es indispensable para los organismos aeróbicos, pero a su vez es potencialmente tóxico para todos los seres vivos, debido a que los agentes tóxicos, incluidos los contaminantes ambientales, perturban el equilibrio redox celular y conducen a una alteración de funciones biológicas normales.

Se producen constantemente durante la oxidación normal de los productos alimenticios, debido a fugas de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Figura 2). La producción de ERO en la mitocondria es modulada en gran medida por la tasa de flujo de electrones a través de complejos de cadena respiratoria.

La cadena de transporte de electrones mitocondrial es considerada la mayor fuente de formación de radicales libres. Del total del oxígeno que llega a la mitocondria, del 5 al 10% se reduce por la acción de los electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria que escapan de ésta, la cual es responsable de la formación del anión O_2^- , que por acción de la SOD se convierte en H_2O_2 y éste a $\bullet OH$ mediante la reacción de Fenton (Maldonado, O. 2010).

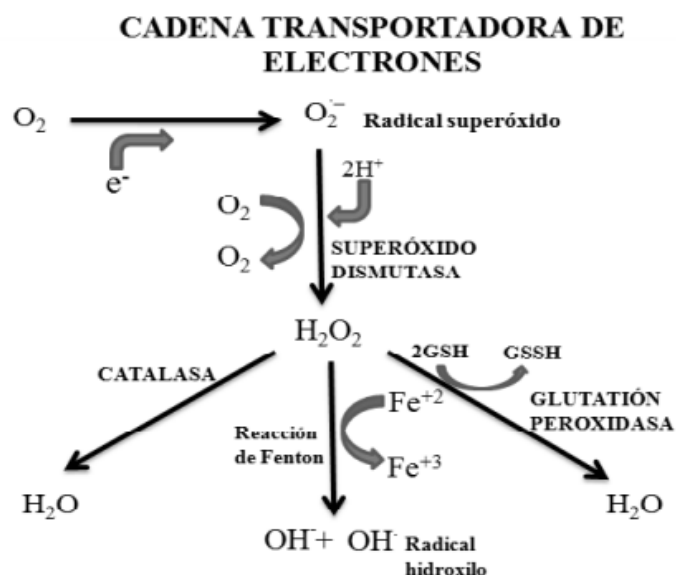


Figura 2. Cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial, que constituye la vía de formación de radicales libres derivados del oxígeno. (Ceballos, G. 2010).

2.3 Sistemas de defensa antioxidante

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres.

En el organismo existen dos tipos de mecanismos para la transformación de radicales libres a moléculas estables: enzimáticos y no enzimáticos (López, L. 2014).

Tabla 2. Principales oxidantes, prooxidantes y antioxidantes en las células de los mamíferos (Cárdenas, N. 2008).

Oxidantes	Antioxidantes
Peroxinitrito	Enzimáticos
Radical hidroxilo	Superóxido dismutasas
Radical alquilo	Catalasa
Radical peroxilo	Glutación peroxidasas
Radical alcoxilo	No enzimáticos
Hidroperóxidos orgánicos	Glutación reducido
Oxígeno singulete	A-tocoferol
Prooxidantes	Ácido ascórbico
Radical superóxido	
Peróxido de hidrógeno	
Óxido nítrico	
Ubisemiquinona	

La familia de glutación peroxidasa (GPx) se encargan de reducir al H_2O_2 y a los ácidos grasos a hidroperóxidos, para lo cual utilizan electrones procedentes de la oxidación del glutación, que actúa como coenzima. Como resultado, el GSH se oxida a GSSG, por lo que, para volver a tener actividad antioxidante, éste debe volver a reducirse otra vez a GSH, lo que se lleva a cabo por la enzima GSSG reductasa a expensas de NADPH, en lo que se conoce como un ciclo redox. (López, L. 2014;Cárdenas, N. 2008).

Dentro de las células el GSH se encuentra principalmente en mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo, es aquí donde se observa un aumento de su concentración en la apoptosis o muerte celular programada.

Puesto que la mitocondria es un organelo esencial para el mantenimiento de la función celular, el GSH mitocondrial es conocido como un antioxidante vital que regula las vías de muerte celular, así como la progresión significativa de las enfermedades. Además, el GSH también funciona como coenzima para otras enzimas antioxidantes, como las glutarredoxinas y las tiorredoxinas (Fernández, J. 2008).

La síntesis de GSH ocurre en dos etapas y depende de la disponibilidad de sustratos y de los mecanismos regulatorios. El paso de regulación en la síntesis ocurre a nivel de la enzima gamma-glutamil cisteinil sintetasa (γ GCS), donde el GSH ejerce el feed back negativo (Figura 3).

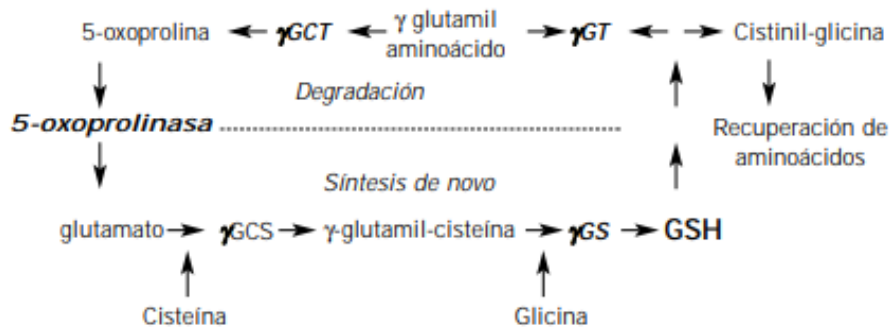


Figura 3. Metabolismo básico del GSH (Sarrasague, M. 2006)

2.4 Tratamientos

Actualmente como principales tratamientos para enfermedades cardiovasculares causadas por estrés oxidativo se ha propuesto una dieta rica en antioxidantes para prevenir o disminuir el deterioro celular del organismo, así como el uso de diferentes fármacos. Dentro de los cuales se encuentra principalmente la vitamina E, la albumina, el alopurinol, la nimodipina (León, D. 2000).

Sin embargo, estos dependerán del padecimiento que se presente. En la actualidad existen cuatro familias de medicamentos recomendados en el manejo crónico de la cardiopatía isquémica (Tabla 3) : el ácido acetilsalisílico (AAS), beta bloqueadores, estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA/antagonistas del receptor de angiotensina 2 -ARA2) y los inhibidores de la aldosterona; al intervenir en la modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona previenen el remodelado ventricular, conservan la fracción de eyección y, en definitiva, reducen la mortalidad.(Bellera, R. 2006;Jaramillo, M. 2018).

No obstante la eficacia de estos tratamientos dependerá de múltiples causas, como el inicio precoz o tardío de la intervención, dosis insuficientes, monoterapia o combinaciones, variabilidad biológica o clínica, entre otros (Sánchez, V. 2013).

Tabla 3. Tratamiento farmacológico en cardiopatía isquémica

Tratamiento	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Ácido acetil salicílico	Impide la agregación plaquetaria mediante la inhibición irreversible de la COX-1 por acetilación de la enzima bloqueando la conversión de ácido araquidónico en tromboxano A2 (protrombótico).	<ul style="list-style-type: none"> ☛ Alergia al ácido acetilsalicílico (AAS), ☛ Úlcera péptica activa y el sangrado activo.
Beta bloqueadores	Unión selectiva, reversible y competitiva con los receptores β -adrenérgicos, ayudando al control de la isquemia de estrés y mejorando la capacidad de esfuerzo.	<ul style="list-style-type: none"> ☛ Bradiarritmias ☛ Broncoconstricción.
Estatinas	Reducen la síntesis de colesterol y aumentan los receptores de LDL y el catabolismo de LDL. También inhiben la proliferación de fibroblastos, factores proinflamatorios y protrombóticos, mejoran la función endotelial y la síntesis de óxido nítrico.	<ul style="list-style-type: none"> ☛ Miopatía con rabdomiólisis ☛ Fallo renal secundario.
IECA/ARA	Reducen los eventos isquémicos y la necesidad de revascularización en pacientes con enfermedad coronaria establecida	<ul style="list-style-type: none"> ☛ Hipotensión, ☛ Tos seca ☛ Disminución de la sensibilidad al gusto. ☛ Erupciones cutáneas y angioedema.

2.5 Tratamientos no convencionales

2.5.1 Nanomedicina

Debido a sus propiedades derivadas del tamaño, las nanopartículas (NP) ofrecen la posibilidad de desarrollar nuevas herramientas para el diagnóstico y tratamiento de las ECV. Entre las potenciales aplicaciones clínicas se encuentra la liberación dirigida y controlada de fármacos para maximizar la actividad terapéutica y minimizar los efectos adversos, además de la capacidad para actuar a bajas dosis y aumentar la ventana terapéutica, las NP pueden provocar respuestas al estrés celular que compensen los mecanismos sistémicos por más tiempo. (Vélez, J. 2018).

2.5.2 Ozonoterapia

Actualmente se han realizado diversos estudios evaluando la ozonoterapia como tratamiento en la insuficiencia cardiaca crónica debido a las propiedades terapéuticas que presenta, dentro de las cuales destacan: mejorar el metabolismo del oxígeno, modular el estrés oxidativo biológico y daño por isquemia reperfusión, modular el sistema inmunológico, intervenir en la síntesis y/o liberación de autacoides (sustancias endógenas con diversas acciones fisiológicas y farmacológicas), regular el metabolismo, además de ejercer un gran efecto germicida (Travagli, V. 2010; Sagai, M. 2011; Borroto, V. 2018).

La ozonoterapia resulta muy útil como coadyuvante en el control de la cardiopatía isquémica, y ha sido demostrada su utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades además de su adecuado margen de seguridad (Borroto, V. 2018).

2.5.3 Dispositivos

El CDI (Desfibrilador cardioversor implantable) está recomendado en cardiopatía isquémica (al menos 6 semanas después de un infarto agudo de miocardio) para reducir la muerte súbita en pacientes con falla cardíaca sintomática, fracción de eyección del ventrículo izquierdo $\leq 35\%$ después de ≥ 3 meses de terapia médica óptima quien se espera que sobreviva por al menos 1 año con un buen estado funcional. (Jaramillo, M. 2018)

2.6 Nanotecnología

La nanotecnología es el área del conocimiento que trata acerca del saber y el control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1 a 100 nm (Figura 4). En esta escala la materia o materiales muestran características y aplicaciones nuevas a las ya tradicionales o conocidas. La nanotecnología comprende la representación gráfica, la medición, el modelado y la manipulación de la materia en una escala nanométrica. (Villafuerte, L. 2009)

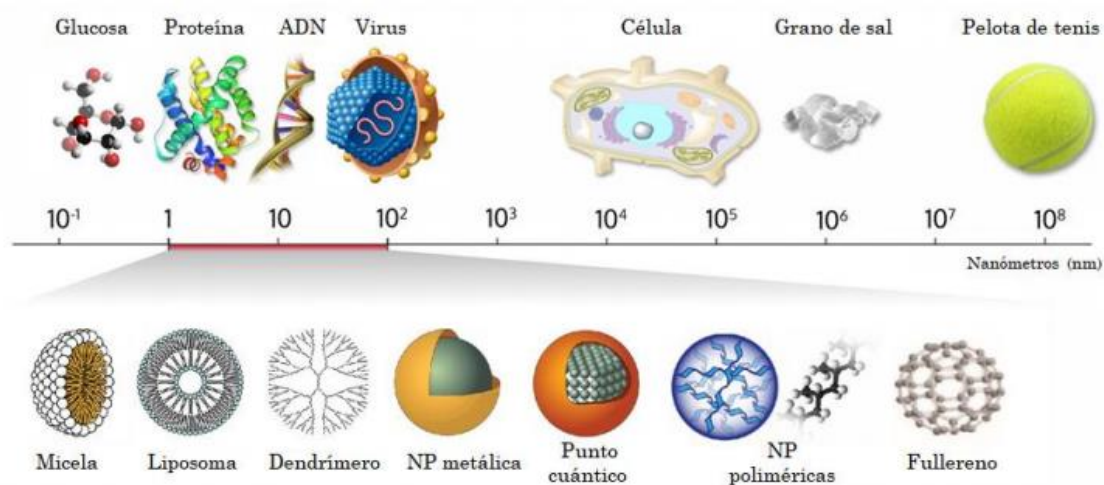




Figura 4. Escala nanométrica que muestra el tamaño de las nanopartículas mediante comparaciones. . (Prior, A. 2018)

La importancia de la nanotecnología farmacéutica para la terapia con fármacos reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de bajo peso molecular, así como macromoléculas como los péptidos, proteínas y genes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés. Esta rama de la nanotecnología se enfoca al desarrollo de formulaciones de agentes terapéuticos en nano-complejos biocompatibles entre los que se cuentan las nanopartículas, las nano-cápsulas, los sistemas micelares, los dendrímeros, los fulerenos o nanoestructuras de carbono, los puntos cuánticos, los nanocomponentes derivados de la bioimitación o biomimética y los productos conjugados derivados de los anteriores (Villafuerte, L. 2009).

Idealmente, los sistemas direccionados deben ofrecer dos características particulares:

-  Conducir el fármaco o la molécula biológicamente activa a su lugar de acción o de absorción, minimizando su degradación prematura y/o su distribución hacia tejidos no diana.
-  Controlar la liberación del fármaco, para que únicamente se produzca en el lugar de acción o de absorción (Martínez, P. 2018).

2.6.1 Nanopartículas

2.6.1.1 Definición



Las nanopartículas (NP) se definen como un objeto pequeño que se comporta como una unidad completa en términos de su transporte y propiedades. Se pueden clasificar según su tamaño y el diámetro (Prabhu, V. 2018).

La característica de una NP reside en el hecho de que la mayoría de los átomos constituyen la superficie, por tanto, las NP tienen superficies de intercambio muy grandes, varios cientos de metros cuadrados por gramo de partículas. Esta superficie de intercambio es muy importante ya que da a las NP sus propiedades físicas y químicas específicas que pueden causar efectos biológicos únicos (Herrera, J. 2017).

En el ámbito farmacéutico, comúnmente se consideran estructuras nanométricas aquellas que tienen un tamaño inferior a una micra y que forman dispersiones coloidales, y estructuras micrométricas aquellas de tamaño superior a una micra e inferior a un milímetro. Los productos resultantes de estos procesos reciben la denominación de micro o nanopartículas y micro o nanocápsulas, dependiendo de su estructura interna (Remuñan, C. 2017).

2.6.1.2 Tipos de nanopartículas

Según el método de preparación, existen dos tipos de nanopartículas poliméricas: nanoesferas y nanocápsulas (Figura 5).

-  **Nanoesferas:** Son sistemas matriciales esféricos, que tienen el agente activo disperso en una matriz polimérica de manera homogénea.
-  **Nanocápsula:** Son sistemas vesiculares que rodean el agente dentro de una cavidad rodeada por una cubierta polimérica, que controla su liberación dependiendo de su naturaleza.

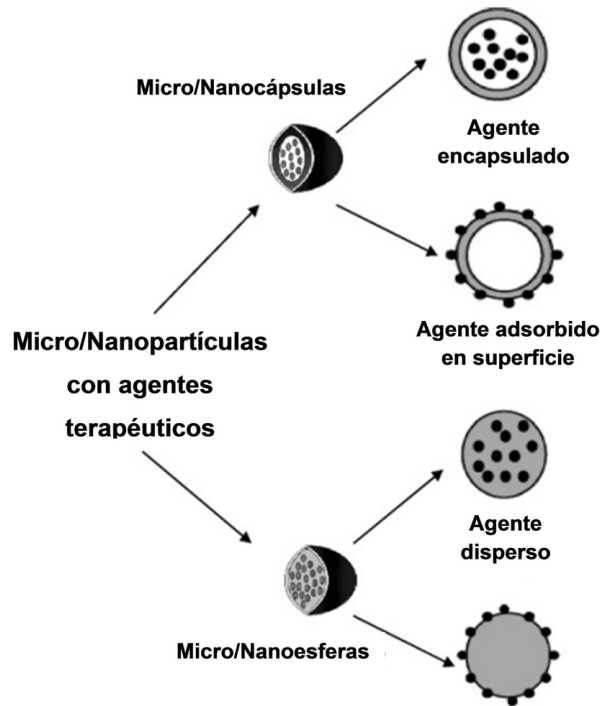


Figura 5. Representación esquemática de las estructuras resultantes de un proceso de micro o nanoencapsulación. (Cortez, P. 2015).

Estas diferencias hacen que ambos tipos de nanopartículas tengan distintas propiedades en cuanto a la forma de liberar su contenido. La selección de la NP dependerá del método de elaboración, las propiedades químicas, físicas y características del fármaco a encapsular (Urrejola, M. 2018).

2.6.1.3 Materiales utilizados en la nanoencapsulación de fármacos

Los materiales capaces de constituirse en micro y nanopartículas se clasifican en tres categorías: Lípidos, proteínas y polisacáridos (Tabla 4).

🦋 **Lípidos:** Se utilizan desde hace tiempo en microencapsulación. Presentan características anfipáticas, que las dotan de capacidad tensoactiva y de propiedades de autoasociación, por lo que resultan muy útiles en nanoencapsulación.

🦋 **Proteínas:** Las proteínas purificadas de origen natural pueden emplearse para formar micro y nanopartículas. La gelatina fue el primer material utilizado en microencapsulación y sigue presentando en la actualidad un importante potencial, al igual que la albúmina.

🦋 **Polisacáridos :** Debido a su gran versatilidad, son los materiales más utilizados tanto en micro como en nanoencapsulación. Dentro de ellos se pueden distinguir polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos:

- a) **Naturales:** Son de naturaleza polisacárida debido a que presentan una gran capacidad mucoadhesiva, de gelificación y una cierta funcionalidad biológica como unirse de manera específica a ciertas proteínas o con receptores celulares.

- b) **Semisintéticos:** Engloban los derivados celulósicos de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad.
- c) **Sintéticos:** Son los poliésteres y los derivados acrílicos. Los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, los más ampliamente utilizados en micro y nanoencapsulación son el poli (ácido láctico) (PLA) y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico ya que son biodegradables y están reconocidos como seguros. Estos polímeros son hidrófobos, mientras que sus productos de degradación, son hidrófilos y fácilmente eliminables del organismo por filtración glomerular. La velocidad de liberación del principio activo encapsulado puede controlarse en virtud de la selección del polímero que presente una adecuada velocidad de degradación (Remuñan, C. 2017).

Tabla 4 . Materiales utilizados en micro y nanoencapsulación de fármacos. (Remuñan, C. 2017)

Materiales	
Lípidos	Cera de carnauba, cera de abeja, alcohol estearílico, ácido esteárico, gelucires, fosfolípidos, ácidos grasos, glicéridos, lípidos catiónicos.
Proteínas	Gelatina, albumina, fibroína, caseína, protamina, poliaminoácidos.
Polímeros	<p>A) Polímeros naturales (polisacáridos): quitosán, alginato, ácido hialurónico, glucomanano, dextrano, goma arábica,</p> <p>B) Polímeros semisintéticos: Carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetobutirato de celulosa, acetofalato de celulosa.</p> <p>C) Polímeros sintéticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> 🌿 Poliésteres: ácido poli-láctico (PLA), copolímeros del ácido láctico y ácido glicólico: (ácido poli-láctico)-coglicólico (PLGA), poliepsilon-caprolactona 🌿 Derivados acrílicos: Eudragits: poli(met)-acrilatos o copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico) 🌿 Polietilenglicol, plianhídros, poliaminoácidos 🌿 Dendrimeros: poliamino dendrimeros (PAMAN), dendrimeros PEGilados.

2.6.1.4 Métodos de preparación

Existen numerosos métodos para la síntesis de NP que permiten el encapsulamiento de moléculas hidrófobas e hidrófilas.

Los procedimientos a utilizar en la nanoencapsulación se determinan principalmente por la naturaleza del material de recubrimiento y las características fisicoquímicas del principio activo. Para la selección del método también se deben tomar en cuenta aspectos económicos y medioambientales relacionados con los materiales y las condiciones de fabricación y almacenamiento así como la vía por la que se pretende administrar las nanopartículas.



2.6.1.4.1 Polimerización

Estos métodos, que tienen como factor común el desencadenamiento de una reacción de polimerización, se pueden dividir fundamentalmente en polimerización *in situ* y emulsión-polimerización (Remuñan, C. 2017).

✨ Polimerización *in situ*: Se basa en la formación de una emulsión de monómero y fármaco en una fase externa en la que el monómero debe ser insoluble. El monómero se polimeriza en este sistema disperso y se forman las nanopartículas sólidas.

✨ Emulsión-polimerización: Se utiliza para la formación de nanocápsulas de policianoacrilatos. En este método una mezcla de aceite, monómero y etanol se inyecta sobre una fase acuosa. La dispersión de la fase orgánica producida por la difusión instantánea del etanol es seguida por una rápida polimerización de los cianoacrilatos en la interfase, catalizada por los iones presentes en el agua. El resultado es la formación de nanocápsulas constituidas por un núcleo de aceite y una capa polimérica de policianoacrilatos

2.6.1.4.2 Emulsión/evaporación

Consiste en la emulsión de dos fases, una acuosa con un agente emulsionante, y una fase orgánica inmiscible en agua, con un principio activo (PA) y un polímero que formará la matriz. Para formar una fase dispersa homogénea se requiere de una fuente de energía que puede ser una sonda de ultrasonido o un sistema de agitación mecánica de velocidad variable. Formada la emulsión, comienza la evaporación del solvente orgánico, que debe ser adecuadamente volátil. El polímero precipita encapsulando principios activos hidrófobos, la polimerización de una emulsión permite crear nanopartículas de tamaño y morfología controlada, para la ejecución y síntesis, en emulsiones o en soluciones que forman micelas seguido de oxidación, polimerización y cubierta (SolGel) (Figura 6) (Urrejola, M. 2018).

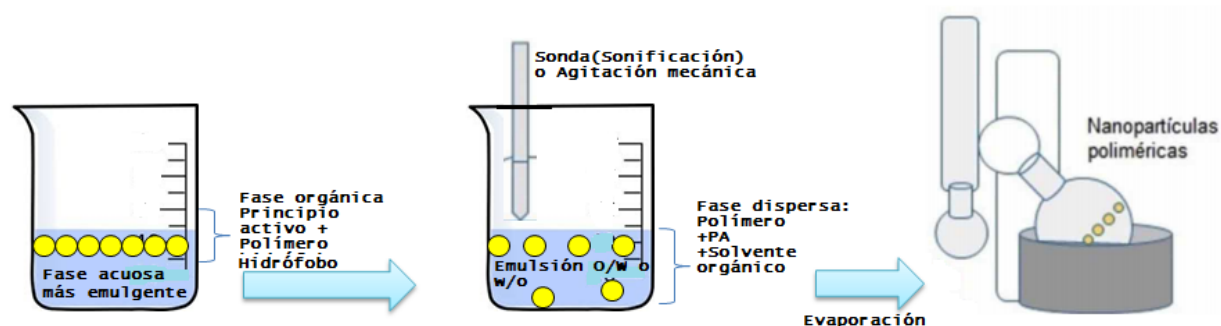


Figura 6. Método de Emulsión/ evaporación.

2.6.1.4.3 Difusión de emulsificación

Utiliza un solvente parcialmente soluble como acetona, en el que se disuelven polímeros o compuestos bioactivos, después, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un estabilizador que evita la agregación de las gotas en la emulsión. Por último, se agrega agua a la emulsión para que se disuelva el solvente y se precipitan las nanopartículas (Figura 7) (Urrejola, M. 2018) .

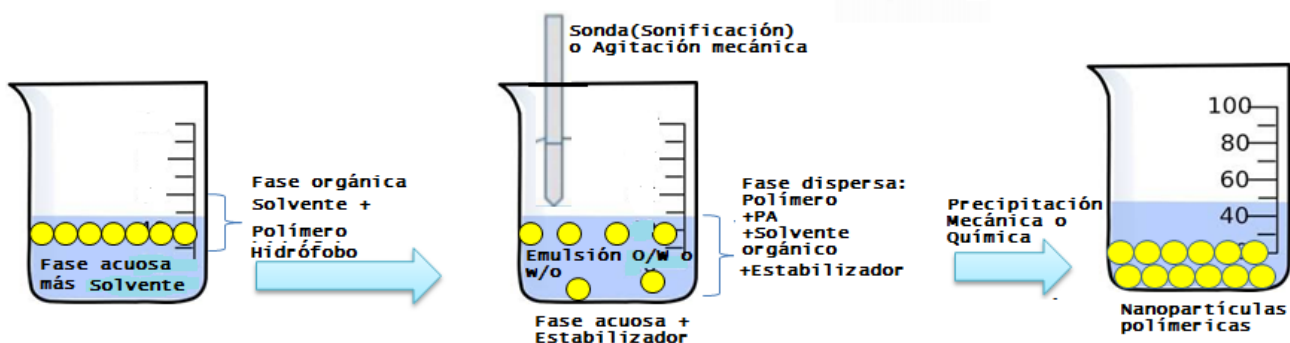


Figura 7. Método de difusión de emulsificación

2.6.1.4.4 Nanoprecipitación:

En este método, moléculas bioactivas y el polímero se disuelven en acetona y se añade una solución acuosa que contiene tensoactivos, la acetona es evaporada y las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa (Figura 8) (Urrejola, M. 2018)

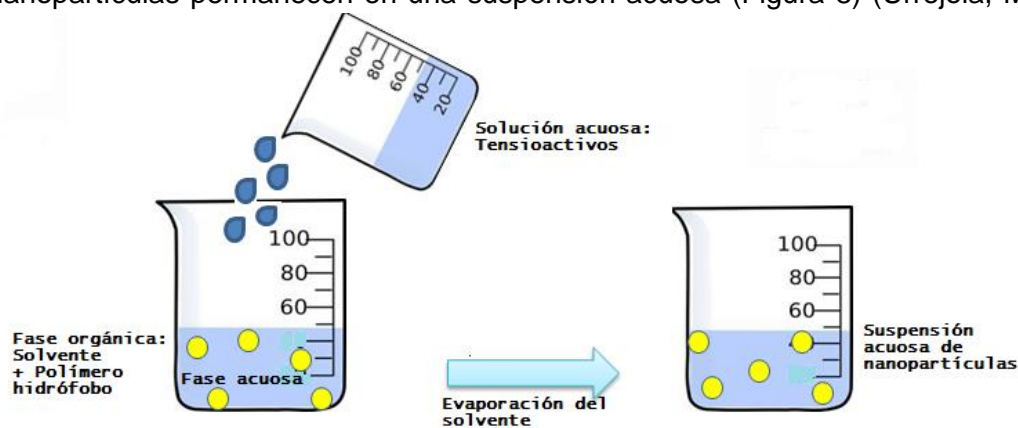


Figura 8. Método de nanoprecipitación.

2.6.1.4.5 Doble o múltiple emulsión

Este método ha permitido encapsular moléculas hidrófilas gracias a la doble emulsión. Aquí, una molécula hidrófila se une a un surfactante y se disuelven en agua. La emulsión está compuesta por la dispersión de la fase acuosa en una fase orgánica, que presenta un polímero disuelto. Finalmente, la emulsión es sometida a evaporación, sin embargo, este procedimiento suele ser tóxico, lo que puede afectar la estabilidad de algunos componentes (Urrejola, M. 2018).

2.6.1.4.5 Método de "Salting-out"

Este método se basa en la disolución de un polímero hidrófobo en un disolvente totalmente miscible en agua. Esta disolución se emulsifica en el seno de una fase acuosa saturada de sal que no permite la difusión del disolvente por un efecto "salting-out". La precipitación del polímero se produce al diluir esta emulsión con agua, lo que dispara la difusión instantánea del disolvente hacia la fase continua. Para este método en general es necesario añadir tensoactivos a la fase acuosa para estabilizar la emulsión (Figura 9) (Remuñan, C. 2017).

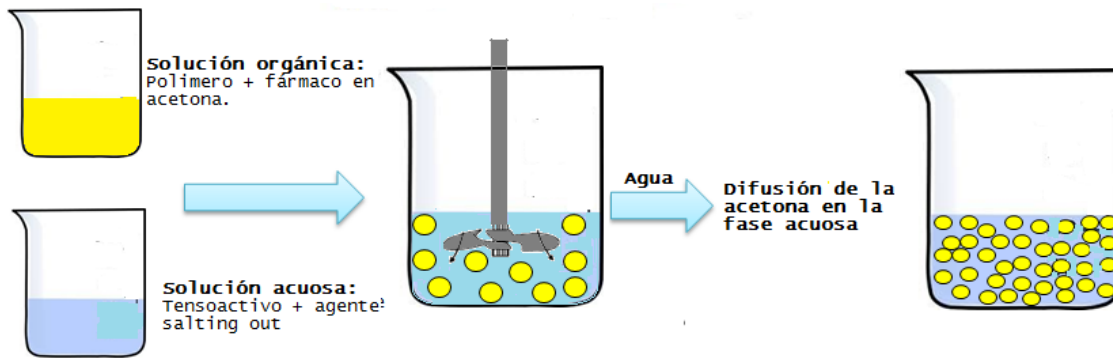


Figura 9. Método de “salting out”

2.6.1.4. 6 Gelificación iónica

El método de gelificación se basa en la utilización de macromoléculas capaces de gelificar tras la adición de iones multivalentes que tienen carga opuesta a las macromoléculas. Bajo condiciones determinadas de dilución de las macromoléculas y los iones, se producen núcleos de gelificación nanométricos en el seno de la fase continua. Este método se ha empleado fundamentalmente con el polímero quitosano y el ion tripolifosfato, aunque también se ha aplicado a otros sistemas como el alginato/calcio.

Generalmente se recurre a la gelificación del polisacárido alginato sódico (polianión) con cloruro cálcico (catión). En otras ocasiones se utiliza el quitosano (policación) y tripolifosfato pentasódico (anión) (Remuñan, C. 2017).

🦋 Principales ventajas:

- Sencillez
- Agitación suave
- Evita el uso de solventes orgánicos
- Es uno de los pocos métodos eficaces para la encapsulación de macromoléculas hidrófilas.

🦋 Desventajas:

- Reducida variedad de polímeros a los que puede ser aplicado
- Tendencia a formar partículas de tamaño elevado (generalmente superior 200 nm)
- Escasa utilidad con fármacos hidrófobos.

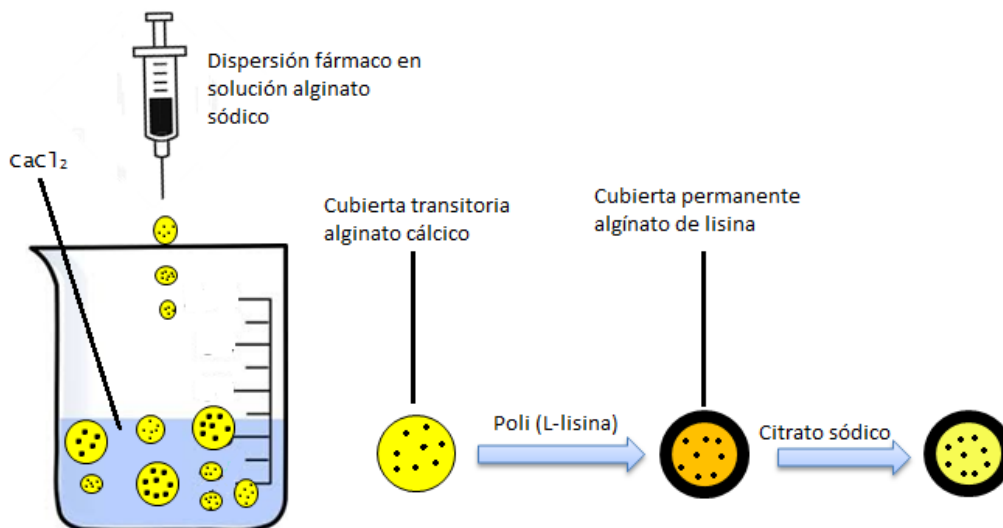


Figura 10. Método de gelificación iónica.

2.6.1.5 Caracterización

Existen diversas técnicas para llevar a cabo la caracterización de nanopartículas. Dentro de los principales parámetros que deben ser caracterizados se encuentran el tamaño de partícula, potencial z y área de superficie (Tabla 5).

Tabla 5. Diferentes técnicas empleadas en la caracterización de sistemas nanoparticulados.

Parámetro	Técnica
Tamaño de partícula	SEM, TEM, ESEM, AFM, PCS
Cristalinidad	XRD, DSC
Potencial Zeta	Electroforesis, Anemometría láser doppler
Área de superficie	BET
Análisis elemental	Espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos x (XPS). Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (H-NMR)

2.6.1.5.1 Tamaño y morfología

El tamaño puede ser determinado por diferentes técnicas, de acuerdo con el diámetro aproximado de las nanopartículas (Tabla 6).

El tamaño de los sistemas nanoparticulados puede ser evaluado mediante microscopía electrónica o difracción de láser (light scattering), debido a que la microscopía óptica convencional está limitada a una resolución de 1 μm .

En particular, la microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy-SEM), además del tamaño, permite estudiar la morfología de las nanopartículas. En esta técnica, la muestra es recubierta (con oro o platino) y utilizada como conductor eléctrico. Los electrones emitidos de la muestra nanoparticulada bajo un vacío elevado son detectados y se forma la imagen.

La microscopía electrónica de transmisión (Transmission electron microscopy-TEM) es ampliamente utilizada para la caracterización de nanopartículas, debido a que permite la visualización directa y la medida de las estructuras coloidales. No obstante, como la cantidad de muestra que puede ser visualizada es muy limitada, resulta conveniente utilizar técnicas complementarias como la ultracentrifugación o medidas de difracción láser (LD) que aportan información sobre el diámetro medio de las partículas y el índice de polidispersión (Rocha, F. 2009;Álvarez, C. 2017).

Otro método utilizado para la determinación del tamaño de nanopartículas es la espectroscopía de correlación de fotones (PCS), técnica basada en la difracción de láser, es ampliamente utilizada en la determinación del tamaño de nanopartículas.

Tabla 6 . Diferentes técnicas empleadas en el análisis del tamaño de partículas.

Técnica	Fundamento	Intervalo de análisis	Ventajas	Desventajas
SEM	Microscopía electrónica (barrido electrónico)	50nm-100µm	Apariencia tridimensional y morfología de la muestra.	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Necesita alto vacío.
TEM	Microscopía electrónica transmisión (electrónica)	50nm-100µm	Mayor capacidad de aumento y mayor resolución que la SEM	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Apariencia bidimensional. Necesita alto vacío.
ESEM	Microscopía electrónica	50nm-100µm	No necesita de recubrimiento conductor. Permite trabajar en modo de bajo vacío. Elevada resolución y gran profundidad de campo	Complejidad de operación.
LD	Difracción de laser	0.5 -900 µm	Amplio rango dinámico. Mediciones rápidas Repetibilidad Retroalimentación Instantánea Alto rendimiento de muestras No requiere calibración Técnica reconocida por ISO13320(2009).	La determinación de tamaños de partícula inferiores se encuentra dificultada. La mayor parte de los programas presupone que las partículas presentan forma esférica, por lo que en los resultados se mezclan tamaño de partícula y forma, cuando el producto analizado está compuesto por partículas irregulares.
PCS	Espectroscopía de correlación de fotones	0.01-1µm	Es una técnica rápida, precisa y que puede ser utilizada en una escala nanométrica de	Si la muestra es polidispersa, esta técnica puede dar lugar a resultados inexactos.

			amplio rango.	
--	--	--	---------------	--

2.6.1.5.2 Potencial Zeta

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de las nanopartículas, que condiciona las interacciones de las mismas con membranas celulares. El potencial zeta puede determinarse mediante anemometría láser Doppler o por técnicas electroforéticas empleando la ecuación de Smoluchowski. Este parámetro describe el comportamiento de una dispersión coloidal estabilizada eléctricamente. Valores alrededor de +/- 30 mV son típicos de sistemas coloidales estables. La formación de agregados suele ocurrir cuando las 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 también depende de las condiciones del medio de dispersión, sobre todo de la concentración de electrolitos y del pH (Rocha, F. 2009).

2.6.1.5.3 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (%) es la relación entre la cantidad encapsulada del fármaco y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación. El contenido en principio activo revela la cantidad real del fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. Los procedimientos para la determinación de la eficiencia de encapsulación y del contenido en principio activo dependerán del polímero utilizado y del fármaco encapsulado. En general, el contenido en principio activo se determina tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de la ultracentrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empleando distintos métodos dependiendo de la naturaleza del principio activo (espectrofotometría-UV, HPLC, ELISA, etc.) (Rocha, F. 2009).

2.6.1.2 Nanopartículas de quitosán-GSH

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosán es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policatiónico le confiere al quitosán alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (p. ej. insulina, pADN, siARN, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica. Dentro de sus propiedades biológicas se ha demostrado que el quitosán es mucoadhesivo, biocompatible, biodegradable, no tóxico y facilita la absorción de macromoléculas, transportándolas a través de las barreras de las mucosas debido a su tamaño (Goycoolea, F. 2009; López, L. 2014).

Las nanopartículas de quitosán tienen la capacidad de unirse a cationes en medios neutros o débilmente ácidos, esto debido a su alta capacidad hidrofóbica consecuencia de un largo número de grupos hidroxilos; así como, su estructura de cadenas poliméricas flexibles las cuales favorecen la formación de complejos con los cationes (López, L. 2014). Es importante mencionar que las nanopartículas de quitosán tienen propiedades fisicoquímicas interesantes en relación al tamaño, estabilidad, adsorción, alta reactividad y facilidad de alcanzar los tejidos diana. Este tipo de nanopartículas es más ventajoso a la hora de cargar, transportar y liberar fármacos en comparación a materiales de escala micrométrica (Carmona, E. 2018).

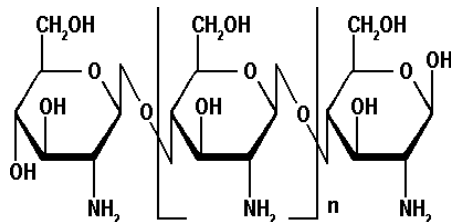


Figura 11. Estructura química del quitosán en proyección de Haworth. (Contreras 2015)

El glutatión (GSH) es una molécula soluble en agua ubicua que se encuentra en concentración milimolar en muchos tejidos y células. Es el péptido intracelular de bajo peso molecular más abundante que contiene un grupo tiol. Esta función tiol es fundamental para la actividad biológica de GSH.

Se sabe que tiene funciones fisiológicas multifacéticas que incluyen la modulación de la transducción de señales reguladas por redox, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación de la proliferación celular, la síntesis de desoxirribonucleótidos, la regulación de la respuesta inmune y a regulación del metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas, sin embargo lo más importante es que el GSH y el metabolismo asociado a GSH proporcionan la principal línea de defensa para la protección de las células contra el estrés oxidativo (Schmitt ,B. 2015)

Varios estudios mostraron que los niveles plasmáticos de GSH disminuyen con la edad. Este deterioro de la homeostasis del GSH podría participar, con otros eventos fisiológicos, en el proceso de envejecimiento y la aparición de enfermedades relacionadas con la edad. Por lo tanto, la suplementación dietética con antioxidantes se ha estudiado ampliamente como una forma potencial de prevenir estas enfermedades al contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo (Schmitt,B. 2015).

Sin embargo, la administración de GSH por vía oral como ingrediente alimentario ha sido limitada debido a su baja biodisponibilidad dada por la degradación de GSH por la enzima intestinal γ -glutamil transpeptidasa, así como su baja captación celular debido a su baja liposolubilidad y su inestabilidad(Valdez, R. 2017 & Rotar, O. 2014).

El uso de nanopartículas como sistema de transporte de fármacos y biomoléculas ha sido de gran ayuda para poder llevar estas moléculas a lugares específicos, protegiéndolos de degradaciones enzimáticas, como es el caso del glutatión (Valdez, R. 2017).

2.7 Cultivos celulares

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *“in vitro”*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Los cultivos celulares se definen como el crecimiento de microorganismos como las bacterias y la levadura, o de células humanas, vegetales o animales en el laboratorio. Los cultivos celulares pueden usarse para diagnosticar infecciones, para probar medicamentos nuevos y para la investigación.

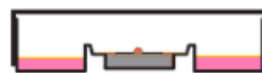
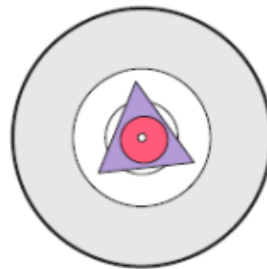
2.7.1 Tipos de cultivo celular

2.7.1.1 Cultivo de órganos

Se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo permite mantener, al menos en parte, la arquitectura característica del tejido “*in vivo*”.

Se conservan las interacciones histológicas y, gracias a ello, este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados, por lo que representan una buena réplica del tejido de origen. Sin embargo, no crecen mucho (la proliferación celular se limita a las células embrionarias de la periferia) y no se pueden propagar. Una de la desventaja de este tipo de cultivos es la necesidad de un nuevo explante para cada experimento lo que supone mucho más trabajo y una limitada reproducibilidad de la muestra. Cuantificar es difícil y la cantidad de material que se puede cultivar es reducida.

Cultivo de órganos



Tejido en una interfase
gas-líquido; la estructura
histológica se mantiene

Figura 12. Representación esquemática de cultivo de órganos

2.7.1.2 Explantes primarios

Se coloca un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie permitiendo que las células localizadas en la periferia del explante se desprendan, migren y proliferen por la superficie del soporte.

Cultivo de explantes

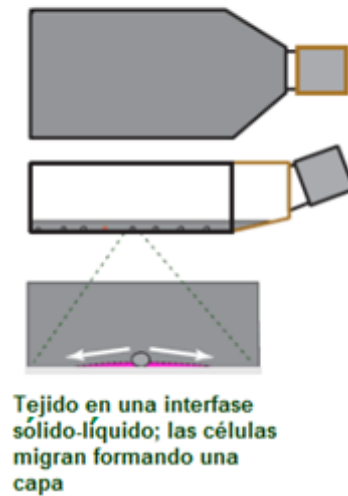


Figura 13. Representación esquemática de cultivo de explantes

2.7.1.3 Cultivo celular primario

Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente.

Existen dos tipos de cultivo celular primario:

🦋 **Cultivos en monocapa:** Las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.

🦋 **Cultivos en suspensión:** Las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes.

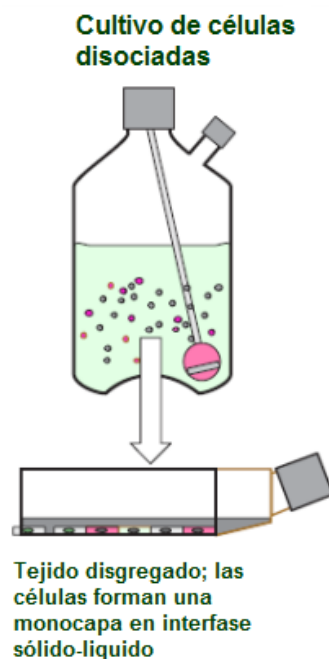










Figura 14. Representación esquemática de cultivo celular primario

2.7.1.4 Cultivos histotípicos y organotípicos

Los cultivos histotípicos son cultivos de un solo tipo celular que consiguen alcanzar una elevada densidad celular (tal y como ocurre en los tejidos). Los cultivos organotípicos constan de varios tipos celulares que interactúan entre sí de una forma que intenta parecerse lo más posible a la original. El órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes, donde libera los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional. Estos cultivos permiten mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero no permite su propagación. La imposibilidad de propagación obliga, en cada nuevo experimento, a partir de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad (Reyes, L. 2017).

El objetivo final de este tipo de cultivos es la creación “*in vitro*” de tejidos u órganos completamente funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en trasplantes. Los cultivos organotípicos constituyen la base de una nueva disciplina denominada ingeniería de tejidos (García 2002).

Tabla 7. Ventajas y limitaciones de cultivo organotípico (Onscience 2018)

Ventajas	Limitaciones
 Células en contacto entre sí por varias caras	 Disfunción de nutrientes y oxígeno
 Representa con más facilidad la realidad “<i>in vivo</i>”	 Alteraciones genéticas asociadas al cultivo
 Mejoran los ratios de crecimiento en cultivos de células mesenquimales	 Limitaciones técnicas en microscopía para su observación y seguimiento.
 Buenos simuladores de	
 dormancia, hipoxia, etc.	

Cultivo organotípico



Diferentes células co-cultivadas con y sin matriz; recreando una estructura organotípica







Figura 15. Representación esquemática de cultivo organotípico

2.7.2 Aplicaciones del cultivo celular

Los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la aplicada. En la investigación básica, permiten estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo:









- ✎ **La actividad intracelular:** transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis, etc.
- ✎ **El flujo intracelular de biomoléculas:** procesamiento del ARN, el movimiento del ARN desde el núcleo hacia el citoplasma, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos, el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos.
- ✎ **Genómica y proteómica:** análisis genético, infección, transformación celular, inmortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas.
- ✎ **Ecología celular:** el estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular y de su diferenciación, el estudio de las necesidades nutricionales, la cinética de la población celular.
- ✎ **Las interacciones celulares:** morfogénesis, proliferación celular, adhesión celular, interacciones con la matriz, invasión celular.

En la investigación aplicada, las técnicas de cultivo celular utilizan en áreas tan diversas como:

-  **Virología:** Cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas.
-  **Biotecnología:** producción industrial de fármacos en biorreactores (interferón, insulina, hormona de crecimiento.)
-  **Farmacología:** Efecto de diversos fármacos, interacciones con el receptor, fenómenos de resistencia.
-  **Inmunología.** Producción de anticuerpos monoclonales, señalización, fenómenos de inflamación.
-  **Toxicología:** citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis.
-  **Ingeniería de tejidos.** Producción de tejidos artificiales (piel, cartílagos) para el tratamiento de quemados, injertos o autotransplantes, desdiferenciación y diferenciación inducida.

2.7.3 Ventajas y limitaciones

Tabla 8. Principales ventajas y desventajas de la utilización de la técnica de cultivos (García, JM. 2002)

Ventajas	Desventajas
<p> Control del medio extracelular. Podemos controlar en un cultivo distintos factores como: pH, temperatura, humedad, presión osmótica, tensiones de O₂ y de CO₂, concentración de nutrientes, etc.</p>	<p> Excesiva sensibilidad. El crecimiento de las células es relativamente lento y es dependiente en muchos casos de factores no del todo conocidos. Además, existen contaminantes como hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas y virus que suelen tener un crecimiento más rápido y pueden llegar a matar las células en cultivo.</p>
<p> Homogeneidad de la muestra. Las células de un cultivo son bastante homogéneas en comparación con la variabilidad existente entre animales de experimentación.</p>	<p> Límite de producción. Generalmente el límite de producción de un laboratorio normal es menor a 10g de células.</p>
<p> Disminución del gasto. Si se experimenta con fármacos, al utilizarse cultivos de células se utilizan concentraciones muy bajas de dichos productos. Recientemente la utilización de sistemas robotizados que utilizan pequeños volúmenes, permite la realización de determinados trabajos que necesitan un gran número de determinaciones repetitivas en diferentes tiempos o con diferentes concentraciones de productos.</p>	<p> Inestabilidad. Muchas líneas celulares continuas son inestables por ser aneuploides.</p>
<p> Disminución de la necesidad de realizar ensayos <i>in vivo</i>. Evitándose, aunque no completamente, el sacrificio de animales de experimentación.</p>	
<p> Desarrollo de cultivos histotípicos y organotípicos que incrementan la fiabilidad de los modelos experimentales</p>	

3. Planteamiento del problema

Las ECV constituyen la primer causa de muerte en todo el mundo, entre estas se encuentra la cardiopatía isquémica, en la cual uno de los factores asociados al comienzo de este padecimiento es la generación de radicales libres, produciendo el aumento de las ERO llevando al tejido cardiaco a un daño celular irreversible.

4. Hipótesis





Si se realiza la administración de nanopartículas de glutatión (antioxidante) a cultivos organotípicos de corazón de rata wistar tratados con peróxido de hidrógeno, encontraremos una disminución del daño celular causado por el estrés oxidativo debido al peróxido de hidrógeno.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Estudiar los efectos de las nanopartículas de Glutatión, en cultivos organotípicos de corazón de rata wistar expuestos a peróxido de hidrógeno.

5.2 Objetivos particulares








-  Elaborar nanopartículas de quitosán-GSH por el método de gelación iónica.
-  Realizar el montaje de cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar utilizando un vibratomo para la recolección de tejido y DMEM, 1X como medio de cultivo.
-  Evaluar los efectos del peróxido sobre la viabilidad de los tejidos de corazón mediante la prueba colorimétrica de reducción de resazurina.
-  Evaluar el daño ejercido por el estrés oxidativo en los cultivos organotípicos de corazón de rata Wistar mediante la cuantificación de GSH y lipoperoxidación (TBARS).

6. Materiales y métodos








6.1 Reactivos y soluciones

6.1.1 Cultivo organotípico





Buffer Krebs-Henseleit (HK)

-  D-glucosa
-  Sulfato de magnesio ($MgSO_4$) (Fermont)
-  Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (J.T.Baker)
-  Cloruro de potasio (KCl) (J.K Baker)
-  Cloruro de sodio (NaCl)
-  Cloruro de calcio ($CaCl_2$)
-  Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (Sigma)

Solución de disección

-  Cloruro de calcio ($CaCl_2$) (Sigma)
-  D-glucosa
-  Cloruro de potasio (KCl) (Sigma)
-  Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
-  Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)
-  Sacarosa 99.5% (Sigma)
-  Rojo de fenol

PBS a pH de 7.5

-  Cloruro de sodio (NaCl)
-  Cloruro de potasio (KCl)
-  Fosfato de disódio (Na_2HPO_4)
-  Fosfato de potasio (K_2HPO_4)

Medio de cultivo DMEM, 1X

Suero fetal bovino

Material biológico

-  Rata Wistar

6.1.2 Nanopartículas

Solución ácida al 1% con pH 4-4.2 99.4% (Cedrosa)

Solución de tripolifosfato al 0.1% en solución ácida al 1%

Pluronic F68 (Sigma)




Quitosán (bajo peso molecular) (Sigma)

L-Glutatión reducido (Sigma-Aldrich)

Glicerol 99% (Sigma)

6.1.3 Cuantificación de GSH

Buffer de reacción

-  DTNB
-  EDTA
-  PBS 1x

Ácido sulfosalicílico al 5%

6.1.4 Determinación de proteínas

- 🦋 Reactivo de Bradford
- 🦋 PBS 1X

6.1.5 Cuantificación de lipoperoxidación (TBARS)

- 🦋 Ácido perclórico
- 🦋 Ácido tiobarbitúrico
- 🦋 DMSO

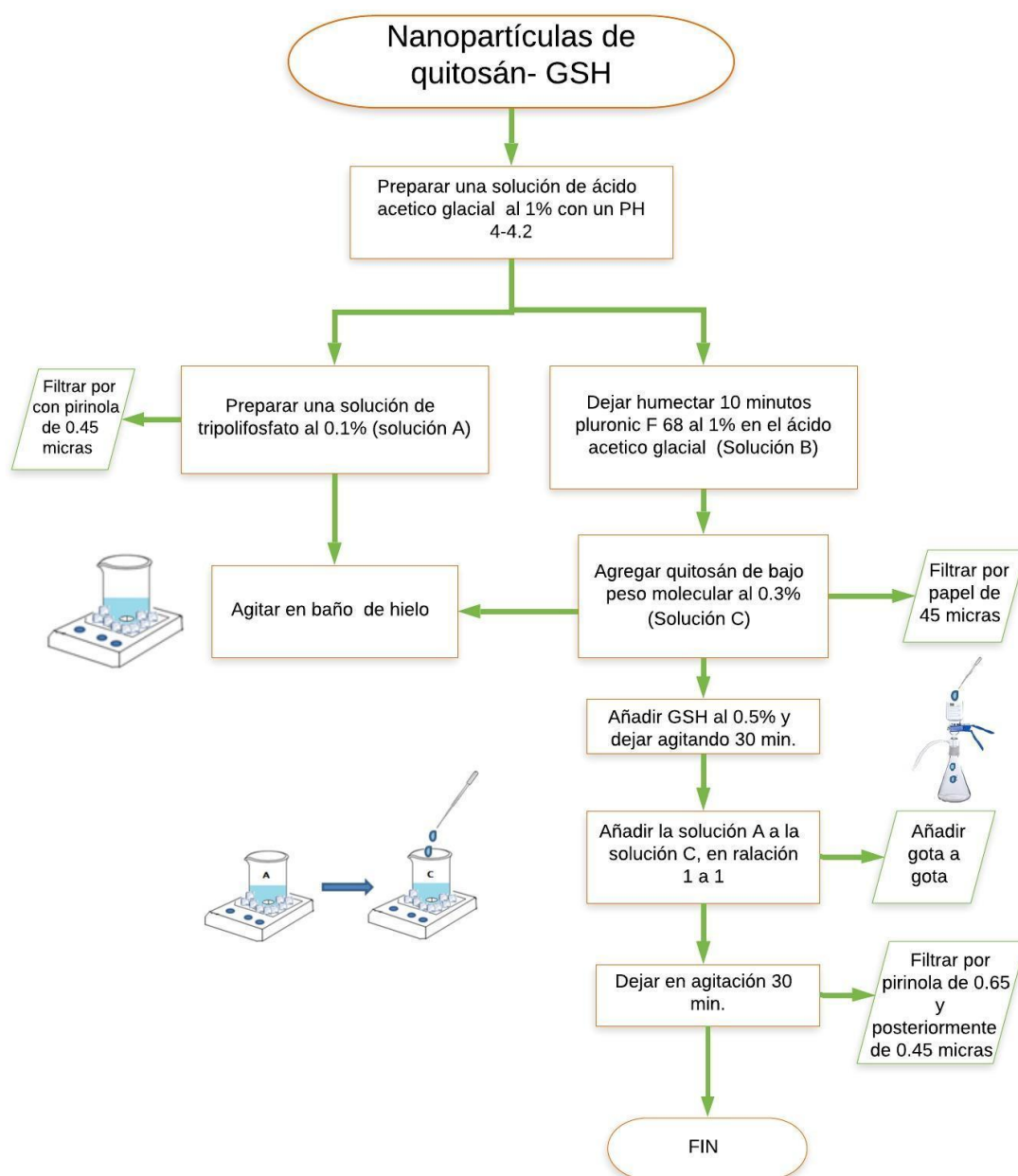
6.2 Aparatos y Equipos

- 🦋 Campana de flujo laminar modelo CFV-90, (INDUSTRIAS FIGURSA).
- 🦋 Incubadora (Shel Lab CO₂ incubator)
- 🦋 Microcentrifuga con control de temperatura (Microfuge 22R Centrifuge Beckman Coulter)
- 🦋 Lector de placa (Thermo Fisher)
- 🦋 Fluorómetro
- 🦋 Balanza analítica
- 🦋 Agitador magnético
- 🦋 Ultracentrifuga XL-100K (Beckman Coulter)
- 🦋 Nanosight NS300 (Malvern)
- 🦋 Baño María (Precision)
- 🦋 Mini incubator
- 🦋 Vibratómo (Leica VT 1200)
- 🦋 Placa de 96 pozos
- 🦋 Placa de 24 pozos
- 🦋 Tubos eppendorf

6.3. Metodología

6.3.1 Sistema de nanopartículas

Las nanopartículas de quitosán-glutión se prepararon por el método de gelación iónica a partir de 2 soluciones a base de ácido acético glacial al 1 % a un pH de 4-4.2. La primera solución consta de pluronic F68 al 1%, quitosán al 0.3% y GSH al 0.5% y la segunda solución de tripolifosfato al 0.1% (Zetina, I. 2019).



6.3.2 Porcentaje de encapsulamiento

Buffer de reacción.

- 1.- Pesar 0.0107g de DTNB y diluirlo en 1 mL de DMSO.
- 2.- Pesar 0.0257 g de EDTA y añadir 10 mL de agua bidestilada.
- 3.- Aforar en un matraz de 25 mL el DTNB con PBS 1X (Solución A)
- 4.- Tomar 5 mL de la solución A y añadir 250 μ L de EDTA posteriormente aforar en un matraz de 10 mL con PBS 1X.
- 5.- Incubar a 15 °C por 20 minutos y cubrir de la luz

Cuantificación de GSH

- 1.- En tubos de ultracentrífuga colocar aproximadamente 5 mL de glicerol
- 2.- Adicionar 5 mL de NP (quitosán y GSH)
- 3.- Colocar aproximadamente 20 mL de solución ácida de ácido acético 1% pH 4-4.5
- 4.- Ultracentrifugar a 20000 rpm a 4 °C por 1 hora.
- 5.- Tomar 50 μ L de sobrenadante y colocar en una placa de 96 pozos.
- 6.- Añadir 150 μ L de buffer de reacción.
- 7.- Leer por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 405 nm.
- 8.- Para poder determinar la concentración de GSH en las nanopartículas se realizó previamente una curva de GSH.

Tabla 9. Volúmenes requeridos de GSH y PBS para la preparación de la curva estándar de GSH.

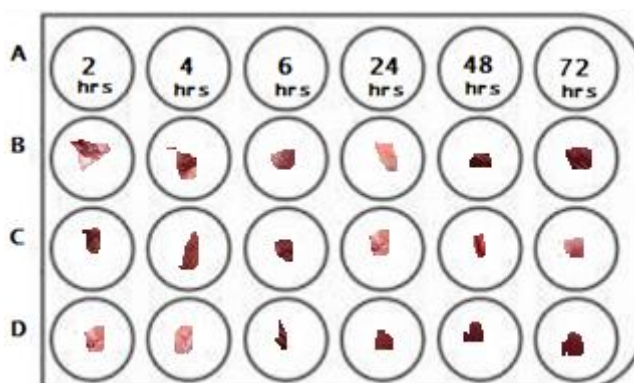
Vol. De solución Stock de GSH (μ L) A	Vol. PBS (μ l) B	Alícuota solución A+B	Concentración μ M
100	900	50	20
200	800	50	40
300	700	50	60
400	600	50	80
500	500	50	100
600	400	50	120
700	300	50	140
800	200	50	160
900	100	50	180
1000	0	50	200

6.3.3 Cultivos organotípicos

6.3.3.1 Viabilidad

1.-Colocar 24 rebanadas de aproximadamente 0.5 cm² de tejido de corazón previamente cortado con ayuda de un vibratómo en una caja de 24 pozos con 1000 µL de medio DMEM 1X e incubar a 37°C y 5% de CO₂.

2.- Dejar los tejidos a diferentes tiempos de exposición (2, 4, 6, 24, 48 y 72 horas).Una vez transcurrido el tiempo retirar el medio de cultivo y realizar lavados con PBS y posteriormente retirar el PBS.



3.-Añadir medio de cultivo y resazurina al 0.03%, obteniendo un volumen final de 1000 µL.

4.-Incubar a las mismas condiciones mencionadas en el punto 1 por 1 hora.

5.- Tomar un volumen de 200 µL de medio y colocarlos en una placa de 96 pozos.

6.- Leer en el fluorómetro a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión.

6.3.3.2 Cultivos organotípicos expuestos con H₂O₂

1.-Colocar 24 cortes de tejido de corazón en una caja de 24 pozos con medio DMEM 1X variando el volumen del medio de cultivo para obtener diferentes concentraciones de H₂O₂ (Tabla 10).Dejando un control negativo.

Tabla 10. Concentraciones de H₂O₂ agregadas a los cultivos organotípicos

Alícuota µL	Concentración mM
5	0.1
25	0.5
50	1
250	5
750	15

2.-Dejar incubar por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, pasado el tiempo de exposición retirar el medio de cultivo y realizar lavados con PBS 1X.

3.- Agregar resazurina y leer por fluorescencia bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

6.3.3.3 Exposición a nanopartículas

- 1.-Colocar 24 cortes de tejido de corazón en una caja de 24 pozos con 25 μL de H_2O_2 Y 975 μL de medio DMEM 1X , dejar incubar por 4 horas a 37°C y 5% de CO_2 .
- 2.-Pasado el tiempo requerido retirar el medio de cultivo y realizar un lavado con PBS, el cual se retira posteriormente.
- 3.-Añadir nuevamente medio de cultivo (el volumen dependerá de la concentración requerida de nanopartículas), y agregar nanopartículas de quitosán-glutati3n reducido y quitosán.

Tabla 11. Concentraciones de nanopartículas adicionadas a los cultivos organot3picos

Tratamiento	Concentraci3n
Control H_2O_2	0.5 mM
Control negativo	1000 μL de medio DMEM 1X
Nanopartículas de quitosán-GSH \rightarrow CB	0.0433 mM
Nanopartículas de quitosán-GSH \rightarrow CA	0.433 mM
Nanopartículas de quitosán \rightarrow CB y CA	El volumen se adiciona dependiendo de la cantidad de nanopartículas de GSH que se adiciona.

- 4.-Dejar incubar durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 .
- 5.- Retirar el medio y realizar un lavado con PBS, a3adir medio de cultivo y resazurina al 0.03%.
- 6.- Incubar durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 , tomar 200 μL y trasvasarlos a una placa de 96 pozos.
- 7.-Leer por fluorescencia a 488 nm de excitaci3n y 525 nm de emisi3n.
- 8.-Colocar los tejidos de coraz3n en 300 μL de buffer lisis.
- 9.-Sonicar la muestra de tejidos en buffer de lisis a 3 pulsos de 10 segundo al 97%

6.3.4 Cuantificaci3n de GSH en cultivos organot3picos.

Buffer de reacci3n.

- 1.-Pesar 0.0107g de DTNB y diluirlo en 1 mL de DMSO.
- 2.- Pesar 0.0257 g de EDTA y a3adir 10 mL de agua bidestilada.
- 3.-Aforar en un matraz de 25 mL el DTNB con PBS 1X (Soluci3n A)
- 4.-Tomar 5 mL de la soluci3n A y a3adir 250 μL de EDTA posteriormente aforar en un matraz de 10 mL con PBS 1X.

Procedimiento para la determinación de GSH

El contenido de GSH se determinó mediante la reacción del GSH y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), en el cual el GSH es oxidado por DTNB y reducido por el NADPH en presencia de glutatión reductasa, formando ácido 2-nitro5-tiobenzoico (TNB) (complejo color amarillo) (Sánchez, J. 2009). El procedimiento que se siguió es el siguiente:

- 1.-Tomar 75 μL de sobrenadante de la muestra previamente centrifugada (12000 rpm, por 15 min. a 4 $^{\circ}\text{C}$) y 7.5 μL de ácido sulfosalicílico al 5%.
- 2.-Dejar incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ de 15-20 min. para formar precipitado.
- 3.-Centrifugar a 12000 rpm por 15 min. a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 4.-Tomar 50 μL de sobrenadante y colocarlos en una placa plana de 96 pozos.
- 5.- Añadir 150 μL de buffer de reacción y dejar incubar durante 15-20 min. a 37 $^{\circ}\text{C}$.
- 6.- Leer por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 405 nm

6.3.5 Determinación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford se basa en la unión del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a los residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina de las proteínas, produciendo una absorbancia de 595 nm. Para determinar la concentración de las muestras se debe realizar una curva patrón utilizando BSA como estándar proteico.

Entre las ventajas de este método se encuentran su compatibilidad con agentes reductores utilizados para estabilizar las proteínas en solución, los cuales no son compatibles con el ensayo de Lowry y en algún grado con el ensayo de BCA, es rápido de realizar y tiene bajo costo (Kruger, NJ. 2010).

- 1.-Centrifugar las muestras anteriormente sonicadas a 12000 rpm, durante 15 min. a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 2.-Tomar 10 μL de sobrenadante y 190 μL de PBS 1X (solución A).
- 3.-De la solución A tomar 10 μL y 190 μL de reactivo de Bradford y colocarlos en una placa plana de 96 pozos.
- 4.-Dejar incubar de 5-10 min. a temperatura ambiente.
- 5.- Leer por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 595 nm.

6.3.6 Cuantificación de lipoperoxidación (TBARS)

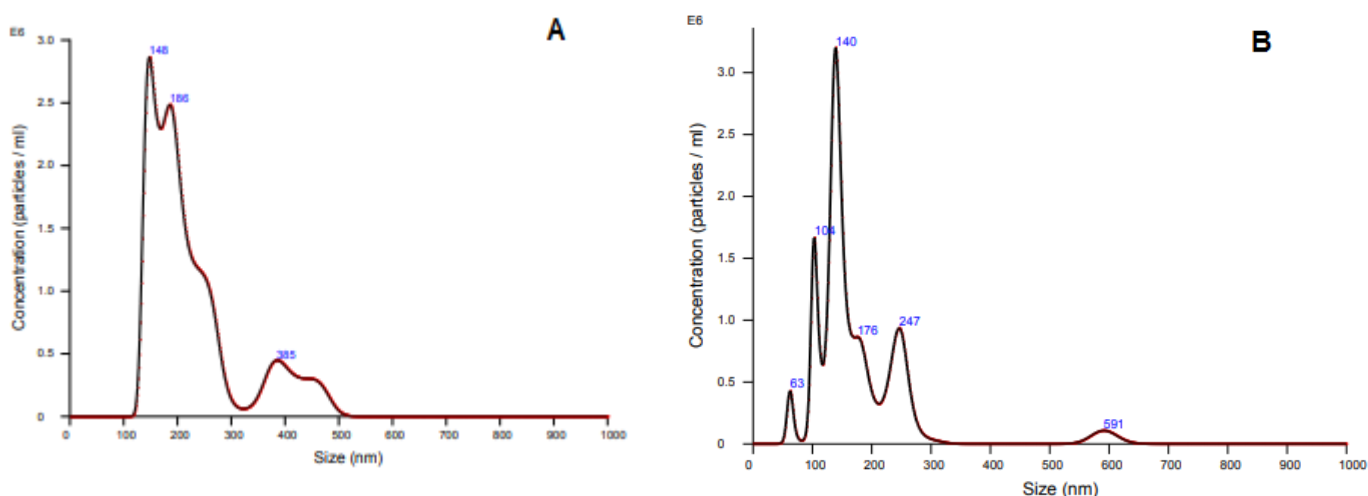
En el presente trabajo, para la determinación de lipoperoxidos se ha empleado una técnica colorimétrica, la cual se basa en la reacción de malondialdehido con ácido2-tiobarbitúrico (TBA). El MDA, en condiciones de pH bajo y alta temperatura reacciona con el TBA dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno o pigmento rosa que es detectable por espectrofotometría o por fluometría (Estepa, V. 2001).

- 1.-Tomar 75 μ L de sobrenadante y añadir 75 μ L de ácido perclórico al 2.5%
- 2.-Dejar incubar de 10-15 min. a temperatura ambiente
- 3.-Centrifugar por 15 min. a 12000 rpm a 4 °C
- 4.-Colocar en microtubos eppendorf 150 μ L de sobrenadante y 150 μ L de ácido tiobarbitúrico al 0.67% (en DMSO)
- 5.-Incubar a 90°C durante 30 min.
- 6.-Leer por espectrofotometría UV-VIS a 535 nm.

7. Resultados y Análisis

7.1 Caracterización de nanopartículas

Se elaboraron dos lotes de NP (quitosán y quitosán- GSH) los cuales fueron evaluados con la finalidad de establecer un tamaño de partícula óptimo así como, su concentración. Su caracterización se llevó acabo en un equipo NanoSight NS300 Malvern. Los datos obtenidos se muestran en la Gráfica 1 además, el promedio de los resultados de las evaluaciones realizadas a las NP se exhiben en la Tabla 12.



Gráfica 2. Distribución de tamaño de los diferentes grupos de nanopartículas. A) NP-Q GSH. B) NP - Q

Tabla 12. Resultados obtenidos de la caracterización de las nanopartículas,

	NP – Q GSH	NP- Q
Media (nm)	225.8	176
Concentración partículas/mL	3.17×10^8 partículas/mL	1.95×10^8 partículas/mL
Encapsulamiento de GSH (%)	99.56%	-

Porcentaje de encapsulamiento

Para calcular el porcentaje de encapsulamiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Encapsulamiento} = \frac{\text{Cantidad de GSH dentro de NP}}{\text{Cantidad teórica de GSH en NP}} \times 100$$

En la cual se tomó el peso real de GSH para sacar la concentración teórica milimolar.

$$\text{Cantidad teórica de GSH dentro de las NP} = \frac{200 \text{ mg} \times 1 \text{ mmolGSH}}{0.040 \text{ L} \times 307.32 \text{ mg}} = 16.26 \text{ mmol}$$

Cantidad real de GSH dentro de las NP

$$\text{Ecuación de la recta } Y = 0.0081x + 0.1068 \mu\text{m}$$

$$X = \frac{0.676 - 0.1068}{0.0081} = 70.271 \mu\text{m}$$

$$16.2696 \text{ mmol} - 0.07027 \text{ mmol} = 16.199 \text{ mmol GSH encapsulado}$$

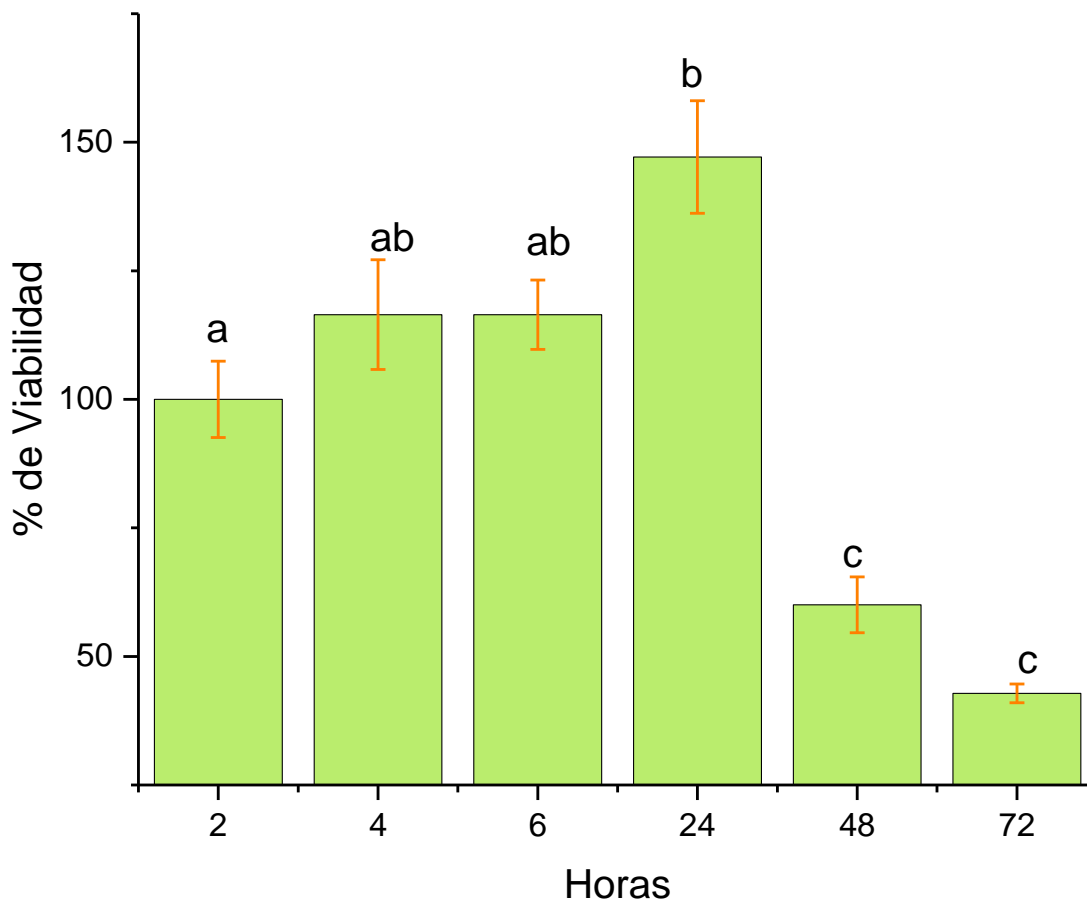
$$\% \text{ Encapsulamiento} = \frac{16.199 \text{ mmol}}{16.2696 \text{ mmol}} \times 100 = 99.56 \%$$

El mecanismo para la formación de nanopartículas de quitosán TPP plantea que la gelación iónica del quitosán ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa (P3O_{10}^{-5} y HP3O_{10}^{-4}), con los grupos $-\text{NH}_3^+$ del quitosán.

Estudios han demostrado que el tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica. A su vez, se ha estudiado el efecto de otras condiciones preparativas y de las características intrínsecas del quitosán, con atención a la composición; peso molecular y grado de acetilación.

En general, el tamaño de partícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm (Piña, S. 2015)

7.2 Viabilidad



Gráfica 3. Comparación de porcentaje de viabilidad de tejidos de corazón incubados a diferentes tiempos. Las barras marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa entre medias $p < 0.05\%$.

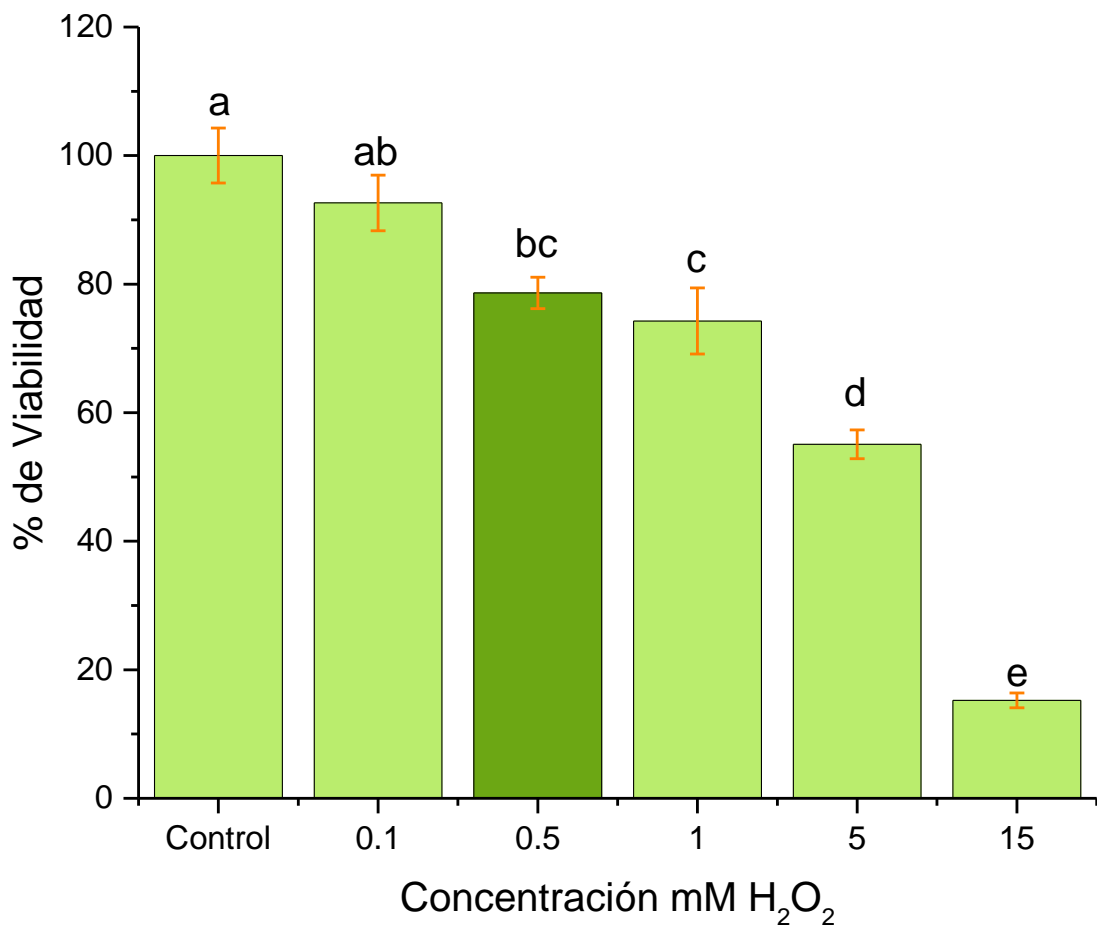
La viabilidad puede definirse como la capacidad relativa de las células o tejidos para realizar sus funciones metabólicas normales.

Para realizar la cuantificación de la viabilidad de los tejidos de corazón se utilizó el método de reducción de resazurina, el cual es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de la resazurina a resofurina (un color rojo altamente fluorescente), que se da por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos (Escobar M & Aristizabál G, 2010).

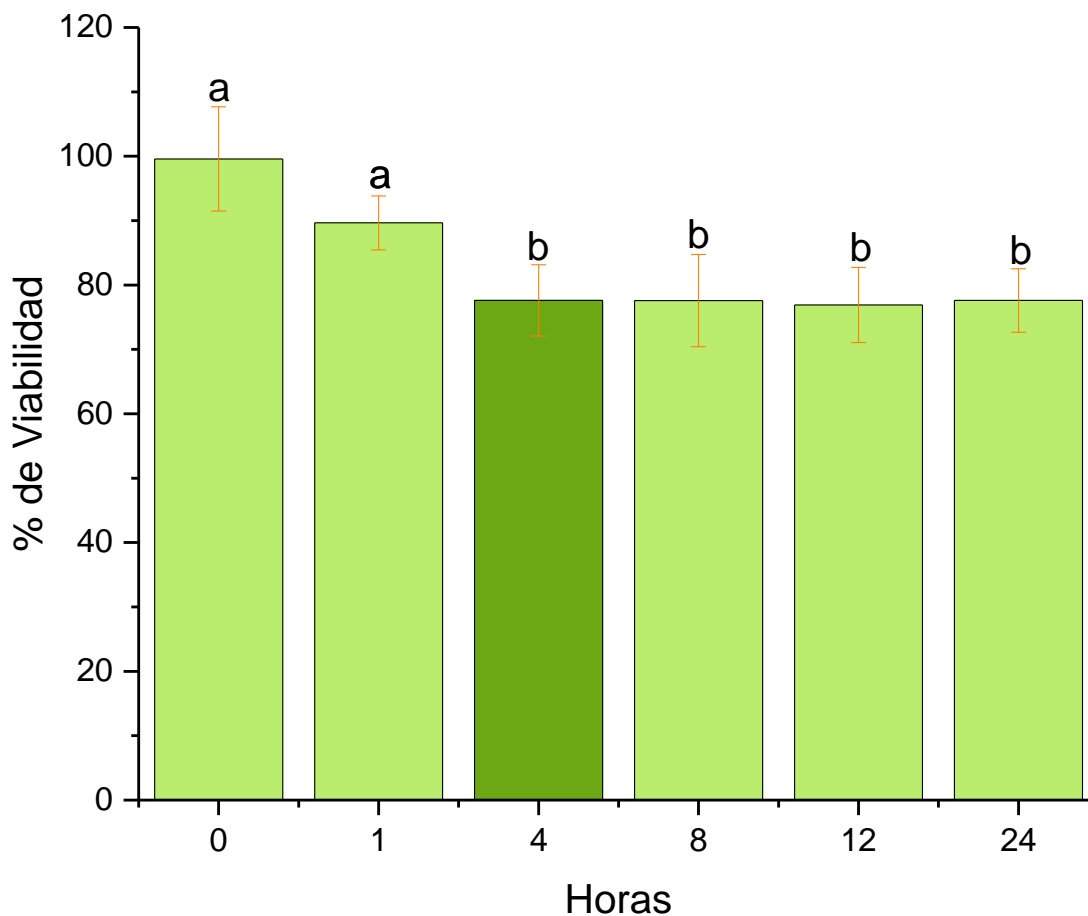
La fluorescencia o señal colorimétrica generada del ensayo es proporcional al número de células vivientes en la muestra.

Como se puede apreciar en la gráfica 2 el mayor porcentaje de viabilidad fue alcanzado a las 24 horas, sin mostrar una diferencia significativa en comparación a los grupos de 2, 4 y 6 horas, sin embargo se puede observar una diferencia significativa con los grupos de 48 y 72 horas, mostrando una notoria disminución de viabilidad.

Estudios recientes han demostrado que las células en cultivo tienden a sufrir un proceso de adaptación a las nuevas condiciones ambientales, es por ello que se cree que la viabilidad más alta es alcanzada hasta después de varias horas. (Martín M. 2012).



Gráfica 4. Comparación de porcentaje de viabilidad de cultivos de tejidos de corazón expuestos a diferentes concentraciones de H₂O₂. Las barras marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa entre medias p<0.05%.



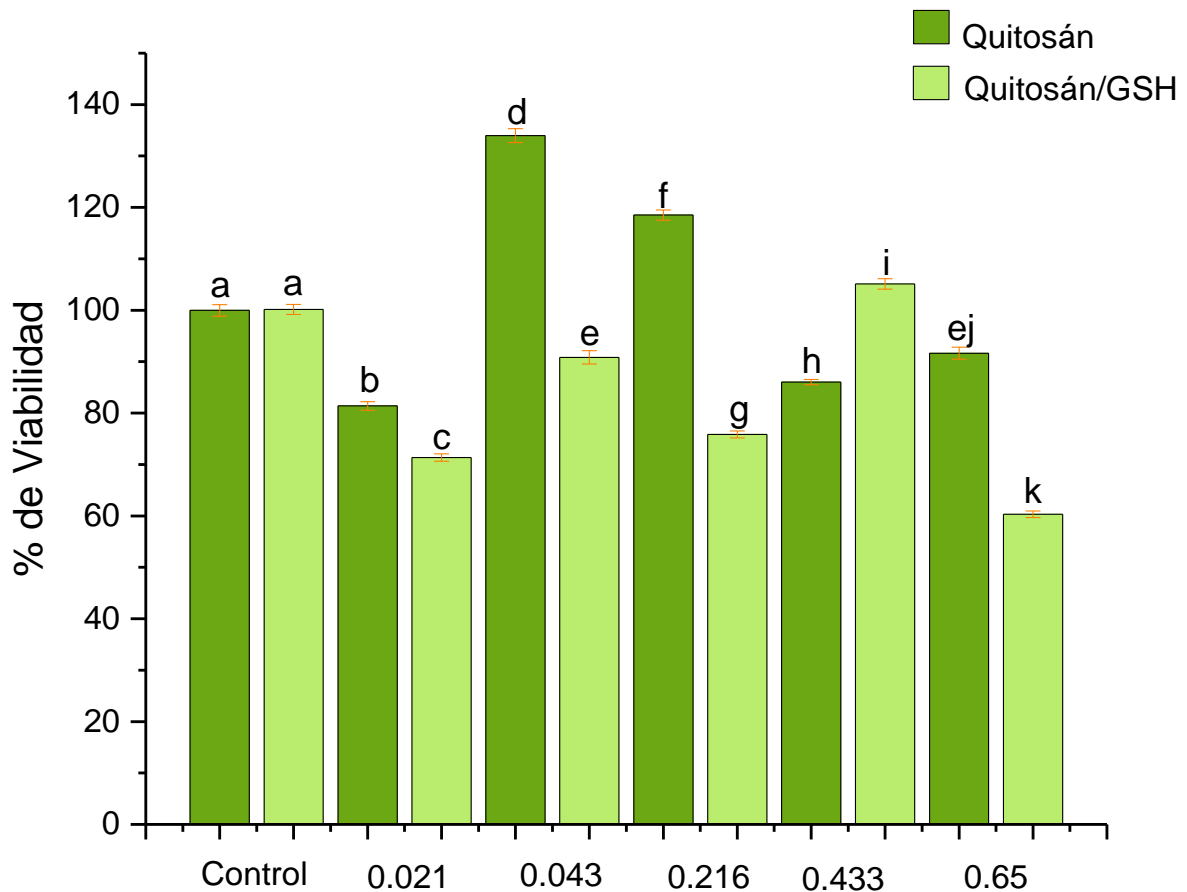
Gráfica 5. Comparación de porcentaje de viabilidad de cultivos de tejidos de corazón expuestos a 0.5mM de concentración de H_2O_2 por diferentes tiempos. Las barras marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa entre medias $p < 0.05\%$.

El H_2O_2 pertenece al grupo de las principales especies reactivas de oxígeno, este puede ser generador de la isquemia cardiaca, así como puede ser uno de los radicales libres derivados de oxígeno en el momento de restaurar el flujo sanguíneo al corazón. Es por ello que se decidió usar como agente citotóxico en los cultivos organotípicos de corazón, este puede causar daño a diferentes macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN al generar el radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Raffan, F 200; Venereo, J 2002).

Por ello se realizó un estudio dependiente de la concentración y del tiempo de exposición de H_2O_2 para evaluar la pérdida de viabilidad en los tejidos de corazón de rata wistar. Después del tratamiento con concentraciones crecientes de H_2O_2 durante 24 horas se determinó el porcentaje de viabilidad mediante el método colorimétrico de resazurina, obteniendo una disminución gradual de la viabilidad celular conforme aumenta la concentración de H_2O_2 (gráfica 3).

Los resultados del estudio de tiempo de respuesta en el que los tejidos fueron expuestos a una concentración de 0.5mM de H_2O_2 durante diferentes tiempos (gráfica 4), se observó que la viabilidad celular disminuyó hasta un 77.62% a las 4 horas de exposición, sin que esta cambiara durante las siguientes horas.

Basándonos en estos resultados, se determinó tratar los tejidos con 0.5 mM de H₂O₂ durante 4 horas. Tenemos la experiencia que cuando un xenobiótico disminuye la viabilidad por debajo del 70%, es muy difícil que la célula se recupere y podemos encontrar resultados muy contradictorios. Por ello, se prefiere trabajar por arriba de 70%.



Gráfica 6. Comparación del porcentaje de viabilidad de cultivos de tejido de corazón expuestos a diferentes concentraciones de NP de quitosán y quitosán/GSH. Las barras marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa entre medias $p < 0.05\%$.

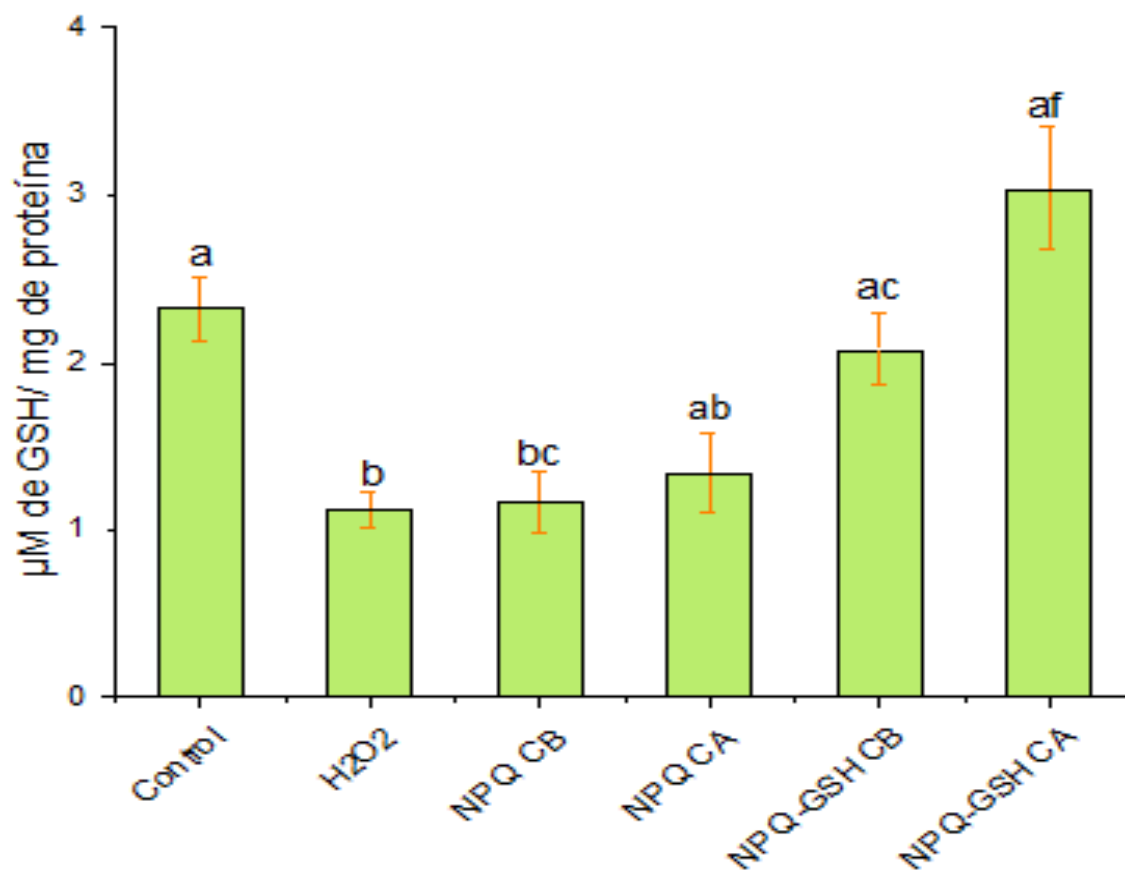
Con la finalidad de establecer las concentraciones de NP a utilizar, se expusieron tejidos a diferentes cantidades de NP en escala logarítmica para poder observar mejor los efectos. Se escogieron dos concentraciones, una mínima y una máxima en escala logarítmica, pero estas tenían que cumplir con la condición de no disminuir la viabilidad demasiado. Otro criterio fue que utilizáramos concentraciones muy similares a las que ya se habían determinado para otros trabajos para poder complementar y comparar resultados.

Los resultados obtenidos (gráfica 5), nos permitieron establecer dos concentraciones: 0.043mM como dosis baja y 0.43mM como dosis alta para ambos lotes de NP (NPQ y NPQ-GSH). Dichas concentraciones están en relación con la cantidad de GSH presente en diferentes volúmenes de NP (Florencia F. 2011).

En el caso de los tejidos de corazón en donde se vio una disminución de viabilidad, se le atribuye al daño que se genera por el pH ácido del vehículo en el que se encuentran las nanopartículas. El pH ayuda a regular muchos procesos celulares, incluido el metabolismo celular, la expresión genética de homeostasis de calcio, la motilidad y contractilidad celular, el acoplamiento célula-célula, adhesión celular y muerte celular. Por lo tanto, el mantenimiento del pH en valores estables y fisiológicos es recomendable para una función celular normal.

En esta primera etapa era muy importante determinar si los tejidos permanecían viables el tiempo que dura la prueba, la concentración de peróxido de hidrógeno que no disminuyera la viabilidad de los tejidos por debajo del 70% y que las concentraciones de nanopartículas utilizadas no fueran citotóxicas per se.

7.3 Cuantificación de GSH en cultivos organotípicos



H ₂ O ₂	-	+	+	+	+	+
NP Q	-	-	+	+	-	-
NP GSH	-	-	-	-	+	+

Gráfica 7. Comparación de la concentración de GSH en cultivos de tejidos de corazón expuestos a diferentes tratamientos, en donde NP Q CB, NP Q CA son nanopartículas de quitosán concentración baja y alta; NP Q-GSH CB, NP Q-GSH CA nanopartículas de quitosán-GSH concentración baja y alta respectivamente. Las barras marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa entre medias $p < 0.05\%$.

En la gráfica 6 se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos tratados con peróxido de hidrógeno y nanopartículas de quitosán, sin embargo los sistemas tratados con nanopartículas cargadas con GSH presentan niveles más altos de GSH mostrando diferencias significativas con respecto al grupo tratado únicamente con peróxido de hidrógeno, evidenciando una clara recuperación de las células después del tratamiento con las nanopartículas cargadas con GSH. Se cree que esto es debido a que las nanopartículas están contribuyendo a modificar la respuesta celular ayudando a la modulación del estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrogeno, debido a que tanto el GSH como el quitosán cuentan con propiedades antioxidantes. (López, L. 2014),

Aumentando los niveles de GSH con ayuda de las NP se pretende modular la actividad de la GPx debido a que actúa como cofactor de esta enzima, activando y acelerando su actividad, y de esta forma equilibrar el estado oxido-reducción, disminuyendo la producción de ROS, radicales libres y la lipoperoxidación (gráfica 7). Las GPx son el mecanismo protector más importante por tener más sustratos específicos y con mayor afinidad a H₂O₂ que las catalasas. (Rebrin I. 2009; Zetina I. 2019; López D. 2020).

La reacción oxido-reducción, catalizada por GPx, involucra la transferencia de 2 electrones (provenientes cada uno de una molécula de GSH), para reducir el H₂O₂ en una molécula de agua. El producto final de la oxidación de GSH es el glutatión oxidado (GSSG), constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro, que es regenerado a su forma reducida (GSH) por la glutatión-reductasa (GSH-R), utilizando un NADPH+H como donador de electrones (Martínez J. 2011).

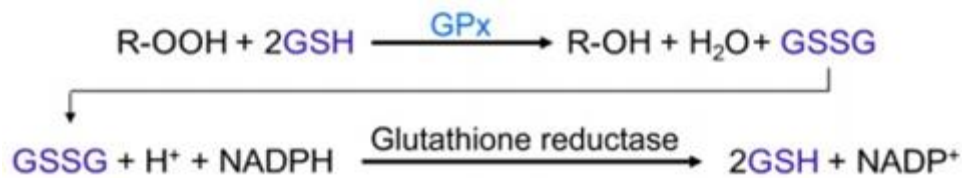
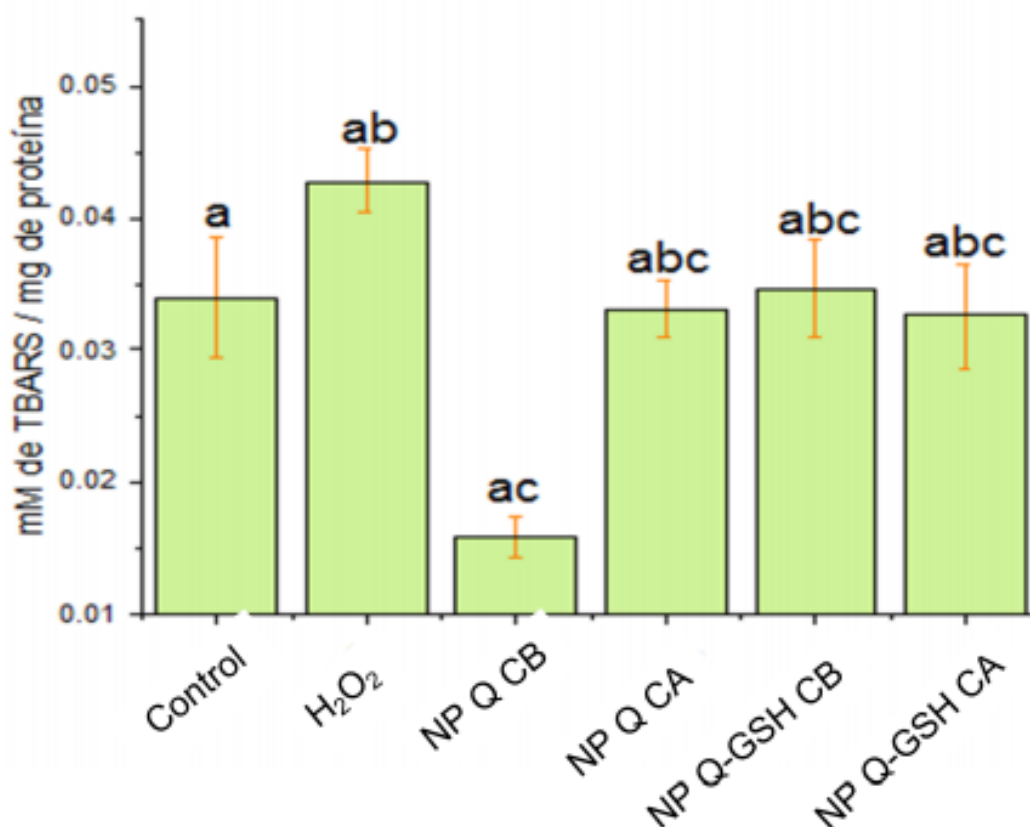


Figura 16. Reacción de óxido-reducción de GSH.

Se ha demostrado que el quitosán posee propiedades antioxidantes; las cuales se debe a su capacidad de eliminar radicales libres al interrumpir la reacción en cadena de la oxidación, incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes, como la GPx, catalasa y SOD, con lo que reduce el MDA. Estudios demuestran que estos efectos se ven incrementados al estar en sistemas nanoparticulados (López LD. 2019; Zheng W., 2013).

7.4 Cuantificación de TBARS en cultivos organotípicos



H ₂ O ₂	-	+	+	+	+	+
NP Q	-	-	+	+	-	-
NP GSH	-	-	-	-	+	+

Gráfica 8. Comparación de la concentración de MDA en cultivos de tejidos de corazón expuestos a diferentes tratamientos, en donde NPQCB, NPQCA son nanopartículas de quitosán concentración baja y alta; NPGSHCB, NPGSHCA nanopartículas de quitosán-GSH concentración baja y alta respectivamente. Las barras marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa entre medias $p < 0.05\%$.

El ensayo de TBARS se ha utilizado para medir la lipoperoxidación mediada por radicales libres y estrés oxidativo. El ácido tiobarbitúrico reacciona con aldehídos provenientes de la oxidación de lípidos, tal como el MDA. Es por ello que este ensayo es el método más común para la evaluación de la peroxidación lipídica en muestras biológicas.

En la gráfica 7 se pueden visualizar los diferentes niveles intracelulares de MDA que se obtuvieron de cada grupo de tejidos, observando que aunque los grupos que fueron tratados con H₂O₂ y posteriormente fueron incubados con nanopartículas de Q CA, Q-GSH CB y Q-GSH CA no muestran diferencias significativas con el grupo que fue tratado solo con H₂O₂, si se puede apreciar que muestran niveles más bajos de MDA en comparación con los de H₂O₂, estos resultados sugieren que las nanopartículas podrían haber ayudado a la disminución de ROS, evitando un aumento de

lipoperoxidación y por consiguiente la de MDA (Zheng, w 2013) . Integrantes del laboratorio han llevado a cabo otros estudios en los cuales muestran que la exposición de las nanopartículas no cambia la concentración basal de MDA, lo que indica que las nanopartículas no inducen estrés oxidativo por si solas en las células, lo que podría descartar la suposición de que las nanopartículas contribuyeron a la lipoperoxidación. (Piña, S 2015; López D. 2020).

En cuanto a las nanopartículas de quitosán concentración baja fueron las que obtuvieron la concentración más baja de MDA, por lo que se puede creer que estas están ejerciendo un efecto protector más efectivo, estos resultados están relacionados con los observados en la prueba de viabilidad (gráfica 5), en donde se mostró que la viabilidad celular aumentaba significativamente en comparación al control; sin embargo en el ensayo de cuantificación de GSH los resultados mostraron que era el grupo con menor concentración, siendo muy similares a las tratadas solo con H₂O₂.

Se ha demostrado que el quitosán podría reducir significativamente las concentraciones de ácido graso libre en suero (FFA), MDA y elevar las actividades de SOD, CAT y GSH-Px, lo que indica que el quitosán regula las actividades de la enzima antioxidante y reducción de la peroxidación lipídica (Liu JN, 2008; López , LD 2019.).

La peroxidación lipídica de las membranas produce daño estructural y funcional, que condiciona un aumento en la permeabilidad de la membrana al calcio, lo que finalmente conlleva un incremento en el calcio intracelular este aumento activa la fosfolipasa y otras enzimas degradantes, que contribuyen de manera importante al daño tisular (Santander S. 2003)

8. Conclusiones

Se estudió el efecto modulador del estado redox de las nanopartículas de quitosán y quitosán-glutación en cultivos organotípicos de corazón de rata wistar, así como el efecto oxidante del H₂O₂, mediante la estimación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) y glutación (GSH) en el tejido.

Tras estos ensayos se determinó que las nanopartículas de Q-GSH concentración alta (0.433mM) y concentración baja (0.0433mM) aumentan los niveles de GSH intracelulares, ayudando a modular el efecto del H₂O₂.

Aunque no se obtuvieron diferencias significativas, se puede observar la tendencia de las nanopartículas de quitosán y quitosán cargadas con glutación de disminuir los niveles de TBARS con respecto a las células tratadas únicamente con peróxido de hidrógeno. El uso de nanopartículas de quitosán como sistema de liberación de GSH es una buena alternativa para ayudar a nivelar la concentración de GSH intracelular cuando se genera un desequilibrio oxidación-reducción por causa de un agente oxidante como el H₂O₂.

9. Perspectivas


En este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de las nanopartículas de quitosán-glutación en cultivos organotípicos de corazón de rata wistar expuestos a H₂O₂, al ser un cultivo que conserva la multicelularidad, la arquitectura compleja y la fisiología del tejido cardíaco permite la evaluación de nuevos fármacos. Sin embargo para conocer mejor los efectos generados por el agente xenobiotico, en este caso las NP, se podría continuar con la evaluación de la modulación del estado óxido-reducción de los cultivos mediante la determinación de actividad de las enzimas catalasa, glutación peroxidasa (GSH-Px) y superóxidodismutasa (SOD) para conocer si estas también sufren un incremento al añadir las nanopartículas debido a las propiedades reportadas del quitosán (López L. 2010).


Sería interesante complementar este trabajo realizando estudios en un modelo *in vivo* al cual se le someta a un estado de isquemia-reperfusión mediante un infarto agudo al miocardio, se recomienda que sea por un IAM debido a que este es más fácil de inducir mediante la oclusión aguda de las arterias coronarias y tiene la ventaja de controlar el lugar, el momento y la duración de la oclusión coronaria así como de la perfusión haciendo posible la obtención de una mayor reproducibilidad en las variables además de poder llevarse a cabo en diferentes cepas de murinos (Nozal M. 2014). En este tipo de modelo se podría tener un mayor acercamiento al mecanismo de las nanopartículas, puesto que se podrían evaluar diferentes propiedades biofarmacéuticas como la biodisponibilidad y afinidad del sistema nanoparticulado hacia el órgano diana, así como una recopilación más amplia acerca del nivel de citotoxicidad que se pueda tener.


10. Referencias


-  Álvarez, C. & Concheiro, A. (2017). Cap. 3 Caracterización de sólidos pulverulentos. En Ramón Martínez Pacheco del libro Tratado de tecnología farmacéutica: Volumen I: Sistemas farmacéuticos (pp 53-57). Madrid: Editorial Síntesis
-  Álvarez, C. & Concheiro, A.(2017). Cap. 6 Dispersiones coloidales y geles. En Ramón Martínez Pacheco del libro Tratado de tecnología farmacéutica: Volumen I: Sistemas farmacéuticos (pp 197-225). Madrid: Editorial Síntesis
-  Antman, E; Loscalzo, J. (2019). Cap.267 Cardiopatía Isquémica. Harrison principios de medicina interna (pp.) New York: McGraw-Hill Medical Publishing
-  Bellera, R., Loma, P. & Heras, M. (2006). Fundamentos del tratamiento farmacológico actual de la cardiopatía Isquémica. Revista Española Cardiología Supl.31 (9), <https://www.revespcardiol.org/es-fundamentos-del-tratamiento-farmacologico-actual-articulo-S113135870674818X?redirect=true>
-  Borroto, V., Suárez, L., Bocci, V.,Lima, L.Cámbara,R.,& Lima, S.. (2016). Ozonoterapia en la Insuficiencia Cardíaca Crónica. Septiembre 19, 2019, de Revista Española de Ozonoterapia <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5506702.pdf>
-  Cárdenas, N., Medina, O. & Pedraza, J. (2008).Cap. 13 Glutión peroxidasas:Una familia de enzimas. En Konigbserg Fainstein Mina del libro Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (pp 201-218). México: El manual moderno.
-  Carmona, E., Plaza, T., Recio-Sánchez, G.& Parodi, J. (2018) Generación de un protocolo para la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con florfenicol a través del método de gelación iónica. Enero 19, 2020 de Revista de investigaciones veterinarias de Perú http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
-  Delgado, L. & Martínez, G. (2009). El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral Oxidative stress in cardiovascular disease: evidences for a more integral treatment. Revista Cubana de Farmacia, 43(1) Recuperado en 02 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000100011&lng=es&tlng=es.
-  Delgado, L., Martínez, G. & Díaz, A. (2009). Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 43(3), 307-313. Recuperado en 22 de agosto de 2019, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-


[29572009000300003&lng=es&tlng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232002000600004&lng=es&tlng=es)


 Delgado, E., Fernández, J. Brown, C., León, A., Flores, H. & García, A. (2002). Estrés oxidativo e infarto agudo del miocardio. *Revista Cubana de Medicina*, 41(6) Recuperado en 02 de agosto de 2019, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232002000600004&lng=es&tlng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232002000600004&lng=es&tlng=es)


 Delgado, L. & Martínez, G. (2010). Papel de las especies reactivas del oxígeno en el daño al miocardio inducido por isquemia/reperfusión. *Revista argentina de cardiología*, 78(1), 54-60. Recuperado en 02 de agosto de 2019, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-37482010000100013&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-37482010000100013&lng=es&tlng=es)


 Díaz, C. (2012) Evaluación toxicológica de nanopartículas de quitosán y dióxido de silicio (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.


 Elejalde, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 50-59. Recuperado en 22 de agosto de 2019, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es.](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es)

 Escobar M, L., & Aristizábal G, F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Febrero 25, 2020 de *Vitae* http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es

 Estepa, V., Ródenas, S. & Martín, M. (2001) Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. Enero 28, 2020 de *Revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*.













 Fernández, J. & García, C. (2008). Cap. 16 Glutación En Konigbserg Fainstein Mina del libro *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. (pp 201-218). México: El manual moderno.

 Florencia, C. (2011) Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/ polimérico sintético para regeneración de tejido óseo (tesis doctorado) Universidad Nacional de la Plata.

 Garcia, JM. (2002). Introducción al cultivo de tejidos. 7 de febrero 2020. Recuperado de <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>









Goycoolea, F., Remuñan-López, C., Alonso, M. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. In: Vila Jato, J.L. ed. *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pp. 103- 13.











-
-  Grande, L., Roselló-Catafau, J.& Peralta,C. (2006) El preacondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. Enero 20,2020 de Revista cirugía española <https://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-pdf-13094694>
-  Herrera, J. (2017) Desarrollo de una nanosuspensión de un derivado de carbamatos (LQM 919) para el tratamiento de garrapatas en vacas (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Jaramillo M, & Zambrano M. (2018) Diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía isquémica en mujeres. Noviembre 27, 2019 de Revista Colombiana de Cardiología [Isevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-diagnostico-tratamiento-cardiopatia-isquemica-mujeres-S0120563317302516#bib0310](https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-diagnostico-tratamiento-cardiopatia-isquemica-mujeres-S0120563317302516#bib0310)
-  Kruger, NJ (1994) El Método Bradford para la cuantificación de proteínas. En: Walker JM (eds) Protocolos básicos de proteínas y péptidos. Methods in Molecular Biology TM, vol. 32. Humana Press.
-  León, D. & Larrondo, H. (2000). Medicina crítica y estrés oxidativo. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 19(3), 196-198. Recuperado en 22 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002000000300009&lng=es&tlng=es
-  Liu JN (2008). Estudio sobre el mecanismo hipolipidémico del quitosano.(tesis de pregrado). Universidad Jiangnan Wuxi, China
-  López , LD., Díaz R., López A., López AG., Piña S. & Ramirez P. (2019) Oxidative stress modulation iduced by chitosan-glutathione nanoparticles in chondrocytes. Febrero 27, 2020 de Pharmazie.. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31288896/>
-  López D., Díaz R.,Martínez J.,Martínez A, Rosales C. & Ramírez P.(2020). Chitosan-Glutathione nanoparticles modify oxidative stress induced by doxorubicin in breast cancer cells. Junio 14, 2020 de Beilstein
-  López, L. (2014) Evaluación del efecto tóxico asociado a la exposición in vitro de sistemas de nanoparticulas preparadas a base de dióxido de silicio (SiO₂), polietilcianocrilato (PECA) y quitosán-GSH sobre la función proteosomal (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo,M. Ceballos,G.& Méndez,E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Septiembre 19, 2019, de 1 Centro de Investigaciones Biomédicas-Doctorado en Ciencias Biomédicas-UV https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf










-
-  Malvern Panalytical. (17 de enero del 2020). Difracción Láser (LD). Recuperado de <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/laser-diffraction>
-  Martín M, Garzón I., Sánchez M. & Alaminos M. (2012). Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana Marzo 2, 2020 de Investigación básica y clínica Actual med. <http://histologia.ugr.es/descargas/MIC-T012012.pdf>
-  Martínez J., Torres PV. & Juárez MA. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Febrero 28, 2020 de Revista de educación bioquímica
-  Martínez, P. (2018) Cap. 5 Formas de administración parenteral. En Tratado de tecnología farmacéutica volumen III: Formas de dosificación (pp. 190-194) España: Ediciones Síntesis.
-  Nozal, P. (2014) Desarrollo de un modelo murino *In vivo* de isquemia y reperfusión miocárdica. Caracterización de la muerte celular y efecto de la obesidad en la inflamación y el remodelado ventricular. (Tesis de posgrado). Universidad Autónoma de Barcelona.
- 
-  Onscience (11 de noviembre del 2018). Cultivos celulares 3D vs cultivos celulares 2D. Recuperado de <https://onscience.es/cultivos-celulares-3d-vs-cultivos-celulares-2d/>
-  Organización Mundial de la Salud. (1 de junio del 2018). Enfermedades crónicas no transmisibles. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
-  Paz Contesse, B. (2010) "Evaluación de la lipoperoxidación *in vitro*, a través de las reacciones del 3-metil-2-benzotiazolidon hidrazona (MBTH) y del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (tesis de pregrado). Universidad de Chile.
-  Prabhu, V., Uzzaman, S., Berlin, V. & Guruvayoorappan, C. (2018). Nanoparticles in drug delivery and cancer therapy: The giant rats tail. En Lino Messana del libro Nanotechnology in drug delivery: fundamentals, design, and applications (pp.65-85). Valley Cottage, NY: Scitus Academics.
-  Rebrin I., & Rajindar S.,(2009). Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging Febrero 27,2020 de Advanced Drug Delivery Reviews <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585506/>
-  Remuñán, C., Alonso, M. & Fuentes, M.(2017). Cap. 4 Micro y nanoencapsulación de fármacos. En Ramón Martínez Pacheco del libro Tratado de tecnología farmacéutica. Volumen II: Operaciones básicas. (pp Madrid: Editorial Síntesis.











-
-  Reyes, L., Jimenez, A., Rodríguez, C. & Moscoso, J. (2017). Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. Febrero 25, 2020
-  Rocha, F. Ansorena, Estella-Hermoso, A., Imbuluzqueta, E., González, D., Blanco-Prieto, M. Nanosistemas a base de poliéster. En: Vila Jato JL. (ed). Nanotecnología farmacéutica. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2009. p. 41-101.
-  Sánchez, J. (2009) Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol (tesis de doctoral). Universidad de Salamanca.
-  Urrejola, M., Soto, L., Zumarán, C., Peñaloza, J., Álvarez, B., Fuentevilla, I. & Haidar, Z. (2018) Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). Enero 13, 2020 de International Journal of Morphology https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022018000401463
-  Vélez, J. & Vélez, J. (2018). Nanodispositivos para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Septiembre 11, 2019, de Gaceta médica de México <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2018/gm183r.pdf>
-  Vicente, S., (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Departamento de investigación biomédica, Fundación clínica Medica sur. Agosto 23,2019 de <http://medicasur.org.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>
-  Villafuerte, L. (2009) Nanotecnología farmacéutica. Enero 9, 2020 de Revista Razón y Palabra <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3101846>
-  Zetina, I. (2019) Efecto de la administración intraarticular de nanopartículas de quitosán con glutatión, en osteoartritis (tesis maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- 
-  Zheng W., Li-Jia I., You-Le Q., Xiao O., Li-Ye Y., & Zi-Rong X. (2013) Chitosan Nanoparticles Attenuate Hydrogen Peroxide-Induced Stress Injury in Mouse Macrophage RAW264.7 cells. Febrero 27,2020 de Marine Drugs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826124/>
-  Sagai, M. & Velio, B. (2011) Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress Medical. Septiembre 19, 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298518/>









-
-  Travagli, V., Zanardi, I., Bernini, P., Nepi, S., Tenori, L. & Bocci, V. (2010) . Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *International Journal of Toxicology*. Septiembre 29, 2019 de <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1091581809360069>
-  Santander, S., Márquez M., Peña, M., Ocaranza, M., De la Peña, E. & Eid, G. (2003) Daño miocárdico por reperfusión. *Revista española de cardiología*. Octubre 1,2019 de <https://www.revespcardiol.org/en-dano-miocardico-por-reperfusion-articulo-13067415>
-  Raffan, F & Kling, J. (2000) Síndrome de reperfusión Fisiopatología, prevención y manejo. Agosto 15, 2020 de <https://www.redalyc.org/pdf/1951/195118021003.pdf>
-  Gutiérrez, R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 17 de agosto de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=es.
-  Schmitt ,B., Vicenzi ,M., Garrel ,C. & Denis , F. (2015) Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. Septiembre 15, 20202 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4536296/#:~:text=Glutathione>.
-  Valdez, R. (2017) Estudio de la capacidad antigenotóxica de las nanopartículas de quitosán-GSH en linfocitos humanos (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Rotar, O., Tenedja,K., Arkhelyuk, A., Rotar, I., Davidencko, S.& Fediv, V. (2014) Preparation of Chitosan Nanoparticles Loaded with Glutathione for Diminishing Tissue Ischemia-Reperfusion Injury. Sepetiembre 15, 2020 de *International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology*
-  Álvarez, C. & Concheiro, A. (2017). Cap. 3 Caracterización de sólidos pulverulentos. En Ramón Martínez Pacheco del libro *Tratado de tecnología farmacéutica: Volumen I: Sistemas farmacéuticos* (pp 53-57). Madrid: Editorial Sintesis
-  Álvarez, C. & Concheiro, A.(2017). Cap. 6 Dispersiones coloidales y geles. En Ramón Martínez Pacheco del libro *Tratado de tecnología farmacéutica: Volumen I: Sistemas farmacéuticos* (pp 197-225). Madrid: Editorial Sintesis
-  Antman, E; LoscalzoE; Loscalzo, J. (2019). Cap.267 Cardiopatía Isquémica. *Harrison principios de medicina interna* (pp.) New York: McGraw-Hill Medical Publishing

-
-  Bellera, R., Loma, P. & Heras, M. (2006). Fundamentos del tratamiento farmacológico actual de la cardiopatía Isquémica. Revista Española Cardiología Supl.31 (9), <https://www.revespcardiol.org/es-fundamentos-del-tratamiento-farmacologico-actual-articulo-S113135870674818X?redirect=true>
-  Borroto, V., Suárez, L., Bocci, V., Lima, L., Cámara, R., & Lima, S. (2016). Ozonoterapia en la Insuficiencia Cardíaca Crónica. Septiembre 19, 2019, de Revista Española de Ozonoterapia <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5506702.pdf>
-  Cárdenas, N., Medina, O. & Pedraza, J. (2008). Cap. 13 Glutación peroxidasas: Una familia de enzimas. En Königberg Fainstein Mina del libro Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (pp 201-218). México: El manual moderno.
-  Carmona, E., Plaza, T., Recio-Sánchez, G. & Parodi, J. (2018) Generación de un protocolo para la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con florfenicol a través del método de gelación iónica. Enero 19, 2020 de Revista de investigaciones veterinarias de Perú http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
-  Delgado, L. & Martínez, G. (2009). El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral Oxidative stress in cardiovascular disease: evidences for a more integral treatment. Revista Cubana de Farmacia, 43(1) Recuperado en 02 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000100011&lng=es&tlng=es.
-  Delgado, L. & Martínez, G. (2010). Papel de las especies reactivas del oxígeno en el daño al miocardio inducido por isquemia/reperfusión. Revista argentina de cardiología, 78(1), 54-60. Recuperado en 02 de agosto de 2019, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-37482010000100013&lng=es&tlng=es.
-  Delgado, L., Martínez, G. & Díaz, A. (2009). Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 43(3), 307-313. Recuperado en 22 de agosto de 2019, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572009000300003&lng=es&tlng=es.
-  Delgado, E., Fernández, J., Brown, C., León, A., Flores, H. & García, A. (2002). Estrés oxidativo e infarto agudo del miocardio. Revista Cubana de Medicina, 41(6) Recuperado en 02 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232002000600004&lng=es&tlng=es.

-
-  Díaz, C. (2012) Evaluación toxicológica de nanopartículas de quitosán y dióxido de silicio (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Elejalde, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 50-59. Recuperado en 22 de agosto de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es.
-  Escobar M,L., & Aristizábal G, F. A.(2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Febrero 25, 2020 de Vitae http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es
-  Estepa, V., Ródenas, S. & Martín, M. (2001) Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. Enero 28,2020 de Revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
-  Fernández, J. & García, C. (2008).Cap. 16 Glutación En Konigbserg Fainstein Mina del libro Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (pp 201-218). México: El manual moderno.
-  Florencia, C.(2011) Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/ polímero sintético para regeneración de tejido óseo (tesis doctorado) Universidad Nacional de la Plata.
-  Garcia, JM. (2002). Introducción al cultivo de tejidos. 7 de febrero 2020. Recuperado de <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>
-  Goycoolea, F., Remuñan-López, C., Alonso, M. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. In: Vila Jato, J.L. ed. Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pp. 103- 13.
-  Grande, L., Roselló-Catafau, J.& Peralta,C. (2006) El preconditionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. Enero 20,2020 de Revista cirugía española <https://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-pdf-13094694>
-  Gutiérrez, R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 17 de agosto de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=es.

-
-  Herrera, J. (2017) Desarrollo de una nanosuspensión de un derivado de carbamatos (LQM 919) para el tratamiento de garrapatas en vacas (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Jaramillo M, & Zambrano M. (2018) Diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía isquémica en mujeres. Noviembre 27, 2019 de Revista Colombiana de Cardiología Isevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-diagnostico-tratamiento-cardiopatia-isquemica-mujeres-S0120563317302516#bib0310
-  Kruger, NJ (1994) El Método Bradford para la cuantificación de proteínas. En: Walker JM (eds) Protocolos básicos de proteínas y péptidos. Methods in Molecular Biology TM, vol. 32. Humana Press.
-  León, D. & Larrondo, H. (2000). Medicina crítica y estrés oxidativo. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 19(3), 196-198. Recuperado en 22 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002000000300009&lng=es&tlng=es
-  Liu JN (JN (2008). Estudio sobre el mecanismo hipolipidémico del quitosano. (tesis de pregrado). Universidad Jiangnan Wuxi, China.
-  López , LD., Díaz R., López A., López AG., Piña S. & Ramirez P. (2019) Oxidative stress modulation iduced by chitosan-glutathione nanoparticles in chondrocytes. Febrero 27, 2020 de Pharmazie.. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31288896/>
-  López D., Díaz R.,Martínez J.,Martínez A, Rosales C. & Ramírez P.(2020). Chitosan-Glutathione nanoparticles modify oxidative stress induced by doxorubicin in breast cancer cells. Junio 14, 2020 de Beilstein
-  López, L. (2014) Evaluación del efecto tóxico asociado a la exposición in vitro de sistemas de nanoparticulas preparadas a base de dióxido de silicio (SiO₂), polietilcianocrilato (PECA) y quitosán-GSH sobre la función proteosomal (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo,M. Ceballos,G.& Méndez,E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Septiembre 19, 2019, de 1 Centro de Investigaciones Biomédicas-Doctorado en Ciencias Biomédicas-UV https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf

-
-  Malvern Panalytical. (17 de enero del 2020). Difracción Láser (LD). Recuperado de <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/laser-diffraction>
-  Martín, Martín M, Garzón I., Sánchez M. & Alaminos M. (2012). Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana Marzo 2, 2020 de Investigación básica y clínica Actual med. <http://histologia.ugr.es/descargas/MIC-T012012.pdf>
-  Martínez J., Torres PV. & Juárez MA. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Febrero 28, 2020 de Revista de educación bioquímica.
-  Martínez, P. (2018) Cap. 5 Formas de administración parenteral. En Tratado de tecnología farmacéutica volumen III: Formas de dosificación (pp. 190-194) España: Ediciones Síntesis.
-  Nozal, P. (2014) Desarrollo de un modelo murino *In vivo* de isquemia y reperfusión miocárdica. Caracterización de la muerte celular y efecto de la obesidad en la inflamación y el remodelado ventricular. (Tesis de posgrado). Universidad Autónoma de Barcelona.
-  Onscience (11 de noviembre del 2018). Cultivos celulares 3D vs cultivos celulares 2D. Recuperado de <https://onscience.es/cultivos-celulares-3d-vs-cultivos-celulares-2d/>
-  Organización Mundial de la Salud. (1 de junio del 2018). Enfermedades crónicas no transmisibles. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
-  Paz Contesse, B. (2010) "Evaluación de la lipoperoxidación *in vitro*, a través de las reacciones del 3-metil-2-benzotiazolidon hidrazona (MBTH) y del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (tesis de pregrado). Universidad de Chile.
-  Piña, S. (2015) Desarrollo de nanopartículas fabricadas a base de quitosán con glutatión y la evaluación de su capacidad para modular respuestas hepatotóxicas (Tesis maestría) Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Prabhu, V., Uzzaman, S., Berlin, V. & Guruvayoorappan, C. (2018). Nanoparticles in drug delivery and cancer therapy: The giant rats tail. En Lino Messana del libro Nanotechnology in drug delivery: fundamentals, design, and applications (pp.65-85). Valley Cottage, NY: Scitus Academics.

-
-  Raffan, F & Kling, J. (2000) Síndrome de reperfusión Fisiopatología, prevención y manejo. Agosto 15, 2020 de <https://www.redalyc.org/pdf/1951/195118021003.pdf>
-  Rebrin I., & Rajindar S.,(2009). Pro-oxidant shifr in glutathione redox state during aging Febrero 27,2020 de Advanced Drug Delivery Reviews <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585506/>
-  Remuñán, C., Alonso, Alonso, M. & Fuentes, M.(2017). Cap. 4 Micro y nanoencapsulación de fármacos. En Ramón Martínez Pacheco del libro Tratado de tecnología farmacéutica. Volumen II: Operaciones básicas. (pp Madridpp Madrid: Editorial Sintesis.
-  Reyes, L., Jimenez, A., Rodríguez, C. & Moscoso, J. (2017). Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. Febrero 25, 2020
-  Rocha, F. Ansorena, Estella-Hermoso, A., Imbuluzqueta, E., González, D., Blanco-Prieto, M. Nanosistemas a base de poliéster. En: Vila Jato JL. (ed). Nanotecnología farmacéutica. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2009. p. 41-101.
-  Rotar, O., Tenedja,K., Arkhelyuk, A., Rotar, I., Davidenko, S.& Fediv, V. (2014) Preparation of Chitosan Nanoparticles Loaded with Glutathione for Diminishing Tissue Ischemia-Reperfusion Injury. Sepetiembre 15, 2020 de International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology
-  Sagai, M.Sagai, M. & Velio, B. (2011) Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress Medical. Septiembre 19, 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298518/>
-  Sánchez, J. (2009) Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol (tesis de doctoral). Universidad de Salamanca.
-  Santander, S., Márquez M., Peña, Peña, M., Ocaranza, M., De la Peña, E. & Eid, G. (2003) Daño miocárdico por reperfusión. Revista española de cardiología. Octubre 1,2019 de <https://www.revespcardiol.org/en-dano-miocardico-por-reperfusion-articulo-13067415>
-  Schmitt ,B., Vicenzi ,M., Garrel ,C. & Denis , F. (2015) Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. Septiembre 15, 20202 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4536296/#:~:text=Glutathione.>

-
-  Sperelakis, N.; (2001). Cap. 23 Na/H Exchanger and pH Regulation. En N. Sperelakis, Y. Kurachi, M. Cohen del libro Heart Physiology and Pathophysiology (pp 427-435) Editorial Academic Press.
-  Travagli, V., Zanardi, I., Bernini, P., Nepi, S., Tenori, L. & Bocci, V. (2010) . Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. International Journal of Toxicology. Septiembre 29, 2019 de <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1091581809360069>
-  Urrejola, M., Soto, L., Zumarán, C., Peñaloza, J., Álvarez, B., Fuentesvilla, I. & Haidar, Z. (2018) Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). Enero 13, 2020 de International Journal of Morphology https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022018000401463
-  Valdez, R. (2017) Estudio de la capacidad antigenotóxica de las nanopartículas de quitosán-GSH en linfocitos humanos (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Vélez, J. & Vélez, J. (2018). Nanodispositivos para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Septiembre 11, 2019, de Gaceta médica de México <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2018/gm183r.pdf>
-  Vicente, S., (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Departamento de investigación biomédica, Fundación clínica Medica sur. Agosto 23,2019 de <http://medicasur.org.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>
-  Villafuerte, L. (2009) Nanotecnología farmacéutica. Enero 9, 2020 de Revista Razón y Palabra <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3101846>
-  Zetina, I. (2019) Efecto de la administración intraarticular de nanopartículas de quitosán con glutatión, en osteoartritis (tesis maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
-  Zheng W.Zheng W., Li-Jia I., You-Le Q., Xiao O., Li-Ye Y., & Zi-Rong X. (2013) Chitosan Nanoparticles Attenuate Hydrogen Peroxide-Induced Stress Injury in Mouse Macrophage RAW264.7 cells. Febrero 27,2020 de Marine Drugs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826124/>

11. Anexos

11.1 Anexo 1: Información teórica complementaria

11.1.1 Reacción del ensayo de TBARS

El método espectrofotométrico del TBA es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA. Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm (Paz. C. 2010).

