



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Estudio de la capacidad antioxidante de dos sistemas
nanoestructurados en cultivos organotípicos de cartílago de rata”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

Hernández Moncada Ximena Guadalupe

ASESORA:

DRA LAURA DENISE LÓPEZ BARRERA

COASESORA:

DRA PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

CUAUTITLÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



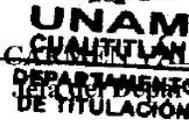
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



A. VOTO APROBATORIO



ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN DERRAMA BRAVO
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 la: **Tesis y Examen Profesional**

Estudio de la capacidad antioxidante de dos sistemas nanoestructurados en cultivos organotípicos de cartílago de rata.

Que presenta la pasante: **Ximena Guadalupe Hernández Moncada**

Con número de cuenta: **316059480** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Diciembre de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Azucena Lee Mendoza	
VOCAL	M. en D. María Verónica Vázquez Cianca	
SECRETARIO	Dra. Laura Denise López Barrera	
1er. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	
2do. SUPLENTE	M. en C. Paulina Fuentes Vázquez	

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

MCVB/cga*

A las valientes ratas de laboratorio, quienes con su entrega y sacrificio han contribuido al avance de la ciencia. Gracias por su valiosa contribución en busca de un mundo mejor.

AGRADECIMIENTOS

Para el proyecto PAPIIT-DGAPA con nombre “Estudio de la respuesta antioxidante inducida por nanopartículas de quitosán con glutatión en la osteoartritis, estudio *in vitro* e *in vivo*” clave IN214321 por el apoyo para realizar el trabajo.

A mi asesora la Dra. Laura Denise López Barrera, así como la Dra. Patricia Ramírez Noguera y el Dr. Roberto Díaz Torres por el apoyo, la atención y los conocimientos transmitidos durante el proceso de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE GRÁFICOS	6
I. Introducción	7
II. Marco Teórico	8
1. Cartílago	8
1.1. Estructura y función del cartílago	8
1.2. Bioquímica del condrona/condrón	9
1.2.1 Colágeno	9
1.2.2 Proteoglicano	10
1.2.3 Glucoproteínas	11
1.2.4 Metaloproteasas	12
2. Osteoartritis	13
2.1. Definición de la osteoartritis	13
2.2. Alteraciones en el cartílago asociado a la osteoartritis	13
2.2.1. Alteración de la homeostasis iónica en el cartílago	13
2.2.2. Proceso inflamatorio y estrés oxidante en la osteoartritis	14
3. Estrés oxidante y antioxidantes	16
3.1. Definición de especies reactivas de oxígeno	16
3.2. Síntesis de las especies reactivas de oxígeno	17
3.3. Estrés oxidante, lipoperoxidación y daño celular	18
3.4. Sistema de defensa antioxidante	19
3.4.1 Catalasa	20
3.4.2 Superóxido dismutasa	20
3.4.3 Enzimas asociadas al glutatión (GSH)	21
3.5. Glutatión	21
3.5.1. Significado y estructura	21
3.5.2. Síntesis de Glutatión	22
3.5.3. Funciones protectoras del GSH	23
3.6. Métodos para medir el daño oxidante	24
4. Cultivo organotípico	25
4.1. Definición	25
4.2. Elaboración de cultivos organotípicos	26
4.3. Ventajas y Desventajas frente al modelo 2D o cultivo celular	26
4.4. Importancia del cultivo organotípico	27

5. Nanotecnología	28
5.1. Definición	28
5.2. Nanoestructura	28
5.2.1. Definición	28
5.2.2. Nanopartículas de quitosán	29
5.2.2.1. Composición y estructura	29
5.2.2.2. Proceso de fabricación	30
5.2.3. Liposomas	31
5.2.3.1. Composición y Estructura	31
5.2.3.2. Proceso de fabricación	32
III. Justificación	35
IV. Planteamiento del problema	35
V. Hipótesis	36
VI. Objetivos	36
Objetivo General	36
Objetivos Específicos	36
VII. Metodología	37
VIII. Resultados y discusión	42
Porcentaje de encapsulamiento	42
Viabilidad	43
%EROs	44
GSH en el tejido	46
GSH en el medio	49
TBARS	51
IX. Conclusión	53
X. Perspectivas	54
XI. Referencias	55
XII. Anexos	62

ABREVIATURAS

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
-SH	Grupo tiol
AP-1	Activador de proteína
ATP	Adenosín trifosfato
BHAL	Células hepáticas humanas
CACO-2	Células de adenocarcinoma colorrectal humano
COMP	Proteína oligomérica del cartílago
CuZnSOD	Superóxido dismutasa asociado a cobre/zinc
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
EC SOD	Superóxido dismutasa extracelular
ERNO	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GA	Grado de acetilación
GAG	Glicosaminoglicanos
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GUV	Liposomas unilamelares gigantes

H2 DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
IL	Interleucina
IL- 1 β	Interleucina 1 beta
IL-1R α	Antagonista del receptor de IL-1
iNOS	sintetasas de óxido nítrico inducible
LOOH	Peróxido lipídico
LUV	Liposomas unilamelares grandes
MDA	Malondialdehido
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas
MnSOD	Superóxido dismutasa de la matriz mitocondrial
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MUV	Liposomas unilamelares medianos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF κ - β	Factor nuclear kappa-b
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NOX	NADPH oxidasa
OA	Osteoartritis
p53	Proteína tumoral p53
pDNA	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
PG	Proteoglicanos
PGE2	Prostaglandina E2
PM	Peso molecular

QNP	Nanopartículas de quitosano
REDOX	Estado oxido-reducción
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SOD	Superóxido dismutasa
SUV	Liposomas unilamelares pequeños
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidores de tejido de MMP
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPP	Tripolifosfato pentasódico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura anatómica del condrón/condrona en el cartílago articular	7
Figura 2. Fisiopatología de la osteoartritis	10
Figura 3. Reacción química entre los antioxidantes y radicales libres	15
Figura. 4 Estructura del Glutati6n	17
Figura 5. Formaci6n del complejo quitos6n-tripolifosfato por reticulaci6n ionotr6pica	25
Figura 6. Estructura de los liposomas	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del cultivo organotípico de cartílago	35
Tabla 2. Esquemas de exposiciones	35
Tabla 3. Porcentaje de encapsulamiento de GSH y determinación de tamaño de partícula para liposomas y nanopartículas	39
Tabla 4. Concentraciones de los tratamientos del peróxido de hidrógeno para la prueba de viabilidad	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Prueba de viabilidad por el método de LDH	41
Gráfico 2. Cuantificación de %EROs en liposomas	42
Gráfico 3. Cuantificación de %EROs en nanopartículas	44
Gráfica 4. Cuantificación de Glutación intracelular en liposomas	45
Gráfica 5. Cuantificación de Glutación intracelular en nanopartículas	46
Gráfico 6. Cuantificación de glutación extracelular en liposomas	47
Gráfica 7. Cuantificación de glutación extracelular en nanopartículas	48
Gráfico 8. Cuantificación de MDA por método de TBARS en liposomas	49
Gráfica 9. Cuantificación de MDA por método de TBARS en nanopartículas	50

I. Introducción

La osteoartritis (OA), como tema central en este proyecto, es uno de los trastornos de salud crónicos más frecuentes en el mundo occidental y particularmente común en adultos mayores. El desencadenante de la OA no es claro; sin embargo, se presume que puede iniciar como consecuencia del daño tisular por lesión mecánica, infiltración de mediadores inflamatorios desde la membrana sinovial hacia el cartílago, o defectos en el metabolismo/homeostasis del cartílago (*Kapoor M., 2015*).

Por otra parte, es sabido que los fármacos convencionales favorecen la disminución de los signos y síntomas, sin embargo, no tienen un efecto en etapas tardías, por tal motivo se ha usado a la nanociencia para la fabricación de sistemas nanoestructurados, con el objetivo de mejorar la respuesta en estadios tempranos y tardíos. La nanotecnología es el estudio y la manipulación de materia en tamaños generalmente entre 1 y 1000 nanómetros. Las nanopartículas están en estudio para la detección, el diagnóstico y el tratamiento de cáncer. Los liposomas fueron desarrollados como un sistema de transporte alternativo a las emulsiones; también, presentan una mejor biodisponibilidad, protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, y pueden ser de liberación prolongada para sustancias activas poco solubles en agua incorporadas en la matriz lipídica sólida (*Garzón, 2008*).

El modelo de estudio seleccionado para este estudio fue el cultivo organotípico ya que tiene la característica fundamental de mantener cierta parte de la estructura anatómica del tejido *in vivo*, debido a que se conservan las interacciones histológicas que preserva los tipos celulares diferenciados, lo que juega un papel importante para un modelo de estudio donde se pretende obtener una réplica del tejido de origen (*García, 2002*).

II. Marco Teórico

1. Cartílago

El cartílago está compuesto por una variedad de tejido conectivo carente de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, fisiológicamente no es autorrenovable localizado en las diartrosis que varía de grosor según las diferentes especies. Macroscópicamente, el cartílago es un tejido blanco, brillante y firme (Forriol Campos, 2002; Vega Álvarez et al., 2002).

Con base en esto, se considera como una unidad funcional al cartílago articular, el líquido sinovial, la membrana sinovial y el hueso subcondral que procura el intercambio de oxígeno y de nutrientes y la liberación de hormonas y factores de crecimiento (Forriol Campos, 2002; Vega Álvarez et al., 2002).

1.1. Estructura y función del cartílago

El cartílago articular es el encargado de reducir la fricción, transfiere y distribuye las solicitaciones en distintas posiciones articulares y ofrece una superficie articular lubricada, lo que permite un movimiento indoloro y de baja fricción de las superficies articulares opuestas y facilita la distribución de cargas, minimizando así la tensión en el hueso subcondral subyacente (Forriol Campos, 2002; Kapoor M., 2015).

El cartílago es un tejido conjuntivo altamente especializado. Este se encuentra constituido básicamente por un tipo de células en particular llamadas condrocitos y a su vez por la matriz extracelular (MEC) (Jiang & Tuan, 2014).

Los condrocitos se definen como células altamente especializadas en la producción y mantenimiento de la MEC, que representan alrededor del 10% del volumen tisular total, con variaciones de unas articulaciones a otras. Existen variaciones en la forma, tamaño y probablemente, la actividad metabólica.

La MEC varía en las diferentes articulaciones y además sufre remodelación constantemente por la acción de diferentes factores anabólicos y catabólicos; está conformada por agua (entre el 60% - 80% del peso total) y macromoléculas siendo

las más importantes: el colágeno y los proteoglicanos (PG). Las macromoléculas estructurales (colágeno, PG y proteínas no colágenas) representan el 20 - 40% del peso total, que en el peso seco corresponde al 60% el colágeno, 20 - 25% los PG y el 15 - 20% las diversas glicoproteínas y proteínas no colágenas (Vega Álvarez, J. et al, 2002).

Dentro de la estructura del cartílago articular se distinguen cuatro estratos que difieren en la estructura, composición (tipos de PG y moléculas de adhesión), orientación y diámetro de las fibras de colágeno así como su volumen y forma de los condrocitos. Se denominan *estratos superficial, de transición, medio o radial y profundo o del cartílago calcificado*. En cuanto a la disposición de la MEC, se establecen tres zonas que se disponen respecto a su composición, éstas son: zona pericelular, territorial e interterritorial, cada una de ellas con funciones y composición diferentes (Forriol Campos, 2002).

1.2. Bioquímica del condrona/condrón

La *condrona* o también referido como *condrón* se le llama al conjunto formado por un condrocito y la zona MEC que le rodea (pericelular y territorial) y constituye la unidad anatómica, citogenética y mecánica del cartílago (Vega Álvarez et al., 2002).

La bioquímica del condrón está determinada por las moléculas que la componen. Las principales son el colágeno, agrecanos, PG, las glicoproteínas y proteasas, aunque se considera al colágeno y proteoglicanos como los dos componentes más importantes y abundantes en la MEC, en la figura 1. se encuentra ilustrado los componentes de la condrona (Forriol Campos, 2002).

1.2.1 Colágeno

Las fibras de colágeno son proteínas encontradas en la matriz extracelular, de la cual se clasifican en cinco tipos: II, VI, IX, X y XI, siendo el colágeno tipo II el principal componente (Vaca-González et al., 2017).

Este componente molecular está compuesto por tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) que contienen como secuencia tripeptídica característica (gly-x-y) y forma una hélice levógira. Las cadenas se enroscan con el fin de estabilizarse entre sí por puentes de hidrógeno entre la glicina y uniones covalentes determinadas por la hidroxilisina. También suelen formarse homotrímeros (las tres cadenas α son iguales entre sí) como en los tipos II y X, y heterotrímeros (las tres cadenas α son diferentes), caso de los tipos VI, IX y X (Vaca-González et al., 2017; Vega Álvarez et al., 2002).

La función principal del colágeno en el cartílago es alinearse de acuerdo con la dirección de la carga soportada por el cartílago para proporcionar al tejido propiedades tensiles e inmovilizar los proteoglicanos en la MEC (Vaca-González et al., 2017; Vega Álvarez et al., 2002).

1.2.2 Proteoglicano

Los PG son macromoléculas constituidas por un núcleo proteico central de ácido hialurónico que se encuentra enlazado a varios dominios globulares al que se le unen largas cadenas de polisacáridos altamente sulfatados denominados glucosaminoglicanos (GAG) que componen la MEC del tejido cartilaginoso proporcionando soporte y tridimensionalidad (Vaca-González et al., 2017; Vega Álvarez et al., 2002). Dentro de sus diversas funciones los PG permiten la polaridad del condrocito al aportar cargas negativas, conferidos por los sulfatos e hidroxilos en los glucosaminoglicanos, desplazando moléculas de agua al interior cuando la fuerza cesa siendo atraídas por dichas cargas negativas, llamada también capacidad de amortiguación (López-Armada et al., 2007).

Los agregcanos son un tipo de PG que constituyen entre el 80 - 90% y la principal macromolécula en el cartílago hialino; son grandes y llamados de esa forma por sus propiedades de agregación. Está conformado por un centro proteico de 2,25 kDa con tres dominios globulares: dos en el amino terminal (G1 y G2) y un tercer dominio en el carboxilo terminal (G3) al que se adhieren cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato. Dichos dominios se encargan de establecer uniones con

el hialuronato para proporcionar la agregación, adhesión celular y aportar a los procesos de apoptosis de los condrocitos (Vaca-González et al., 2017; Vega Álvarez et al., 2002) También le brindan al tejido una capacidad de resistencia osmótica y propiedades de compresibilidad (Kapoor M., 2015).

Existen otro tipo de PG de bajo peso molecular que se encuentran en la MEC que ayudan a estabilizar y pueden actuar organizando el entramado del colágeno del tipo II, como son la decorina que poseen una proteína central de 30 kDa y la fibromodulina considerando que contienen una cadena de condroitín sulfato (Vaca-González et al., 2017; Vega Álvarez et al., 2002).

1.2.3 Glucoproteínas

Las glucoproteínas son moléculas que presentan en su estructura una base proteica unida a oligosacáridos dependiendo de su función será el lugar en el que se encuentra en la célula. Las glucoproteínas transmembrana sirven como receptores para moléculas de adhesión, factores de crecimiento e interleucinas; en cambio, las extracelulares se encargan de la unión y ensamblaje de componentes de la MEC y los condrocitos (Vega Álvarez et al., 2002).

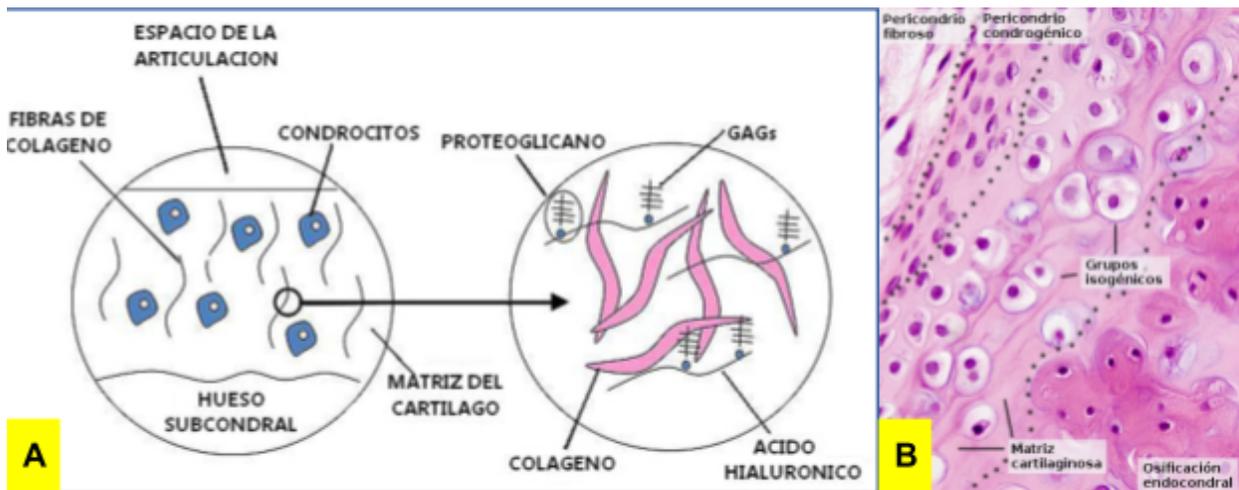
Dentro de las glucoproteínas estructurales más importantes se encuentran la ancorina CII situada en la superficie del condrocito encargado de unir el colágeno y anclar los condrocitos a las fibras colágenas de la MEC. Por consiguiente, la fibronectina está localizada a nivel pericelular y le permite al condrocito adherirse a la MEC, fibrina, colágeno tipo II, heparina, hialuronato, etc. La laminina se presenta en la membrana basal y, unida a receptores, en la superficie de las células. La proteína oligomérica del cartílago (COMP) es una glicoproteína no colagenosa que se encuentra en la MEC y promueve el crecimiento, proliferación y fijación de las células en su entorno. Otra glicoproteína que forma parte de las de adhesión, son las integrinas que regulan procesos de adhesión, migración, proliferación y diferenciación de los condrocitos (Vaca-González et al., 2017; Vega Álvarez et al., 2002).

1.2.4 Metaloproteasas

Las metaloproteasas son enzimas proteolíticas que se encargan de la catálisis en la MEC. En condiciones fisiológicas estas enzimas desempeñan un papel clave en la degradación irreversible de la arquitectura articular normal (López-Armada et al., 2004).

Esta familia de enzimas se compone, al menos, de 18 miembros, que estructuralmente se clasifican en 5 subgrupos: a) colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13); b) gelatinasas (MMP-2, MMP-9); c) estromelinas (MMP-3, MMP-10); d) estromelinas de membrana (MMP-14, MMP-15), y e) otras (MMP-7, MMP-12). La actividad enzimática de estas enzimas está estrictamente controlada por sus inhibidores específicos, denominados inhibidores de tejido de MMP (TIMP). Se han identificado 3 formas diferentes de inhibidores de MMP en los tejidos de la articulación humana: TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 (López-Armada et al., 2004).

Figura 1. Estructura anatómica del condrón/condrona en el cartílago articular



Nota: Tomado de Segura Trepichio y Cardona Vives, 2017; y Megías et al., 2016

2. Osteoartritis

2.1. Definición de la osteoartritis

La osteoartritis (OA) se define como la enfermedad inflamatoria degenerativa crónica que afecta la estructura de la articulación (cartílago hialino, hueso subcondral, membrana sinovial, etc.), caracterizada por degeneración y pérdida progresiva del cartílago articular que es causada por la desregulación entre síntesis y degradación de la matriz extracelular del cartílago, donde también están implicados el hueso y la membrana sinovial en un proceso bioquímico mediado por citoquinas y factores de crecimiento que, a su vez, participan en el proceso de remodelación ósea y destrucción articular, que conducen a la inflamación de la membrana sinovial (sinovitis) y el crecimiento de nuevo hueso y cartílago (osteofitos) (Arias Cantalapiedra 2017; Cajigas et al., 2011; Pérez Gastell et al., 2000).

2.2. Alteraciones en el cartílago asociado a la osteoartritis

2.2.1. Alteración de la homeostasis iónica en el cartílago

La OA es el padecimiento que causa diferentes alteraciones fisiológicas de acuerdo al grado de daño en el que se encuentre el padecimiento. La fisiopatología describe el desequilibrio producido por los procesos catabólicos y anabólicos y la despolarización del condrocito, el cual origina la degradación de la MEC y la destrucción acelerada del cartílago articular (Sánchez Naranjo et al., 2011).

Mientras la MEC se encarga de proteger a los condrocitos del potencial daño de las fuerzas mecánicas, los condrocitos llevan a cabo la homeostasis encargándose de la renovación de la composición de la matriz sintetizando o degradando macromoléculas, pero con el tiempo pierde la capacidad para realizar sus actividades, por lo que el riesgo al desarrollo y progresión del deterioro del cartílago articular aumenta (Kapoor M., 2015).

El condrocito hace uso de los canales de agua e iones, PG, MMP y agreganasas, no obstante, en desequilibrio ocasiona alteraciones en la producción de la matriz

que en la primera fase de la enfermedad promueven el depósito de colágeno y proteoglicanos en cúmulos desordenados, lo que refleja una mayor producción de estas sustancias como respuesta a la destrucción aumentada (Sánchez Naranjo et al., 2011; López-Armada et al., 2007).

Los proteoglicanos confieren a la matriz del cartílago una composición iónica y osmótica diferencial, que aporta la polaridad que el condrocito necesita; sin embargo, la destrucción de los PG implica que desaparecen sus cargas negativas, por lo que se altera la distribución iónica propia del cartílago y así como el potencial de membrana del condrocito, lo que afecta sus funciones y empeora el tejido (Sánchez Naranjo et al., 2011; López-Armada et al., 2007).

Estudios previos realizados en cultivo de condrocitos han mostrado que si se modifica el sodio extracelular se producen cambios en los componentes de la MEC (proteoglicanos y colágeno): un aumento de la síntesis de proteoglicanos no agregados, biglicano y decorina y un aumento de la síntesis de colágeno tipo X. Lo anterior ocurre principalmente en la artrosis avanzada cuando la concentración intracelular, principalmente de Na^+ , aumenta de forma significativa (López-Armada et al., 2007; López-Armada et al., 2004).

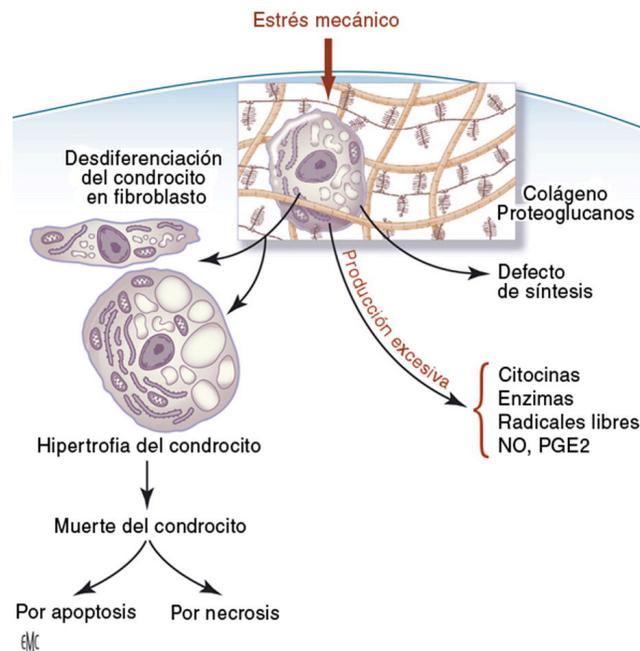
2.2.2. Proceso inflamatorio y estrés oxidante en la osteoartritis

Seguido del desbalance producido por el catabolismo de la MEC, como resultado, aumenta la síntesis de mediadores proinflamatorios. Entre los más importantes se encuentran $\text{IL-1}\beta$, NO y $\text{TNF}\alpha$ que actúan activando caspasas que promueven la muerte celular, entre otras funciones, de esta manera da lugar a un descenso en la celularidad por apoptosis con una consecuente pérdida del cartílago. Se piensa que la apoptosis juega un importante papel en la génesis del proceso (López-Armada et al., 2004).

Mediadores como MMPs y agreganasas, al activarse por diferentes sustancias inflamatorias, inducen destrucción de las fibras de colágeno y de los proteoglicanos y los fragmentos de fibronectina, resultantes de su digestión enzimática, los cuales tienen efectos potenciadores en el catabolismo de la matriz.

Actualmente, dichas enzimas son encontradas en altas concentraciones de cartílagos artrósicos, pero sobre todo la enzima estromelisin-1 (MMP-3). La MMP-3 se presume puede tener un papel central en la iniciación y progresión de la destrucción de la matriz del cartílago por su capacidad de activar formas inactivas de MMPs (López-Armada et al., 2004; Sánchez Naranjo et al., 2011; Membrillo Ortega, 2003).

Figura 2. Fisiopatología de la osteoartritis



Nota: Tomado de Chevalier, 2009

Continuando con los mediadores proinflamatorios, el óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso, sintetizado a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas llamadas sintetisas del óxido nítrico (NOS). El NO es un radical gaseoso, es lábil y en presencia de oxígeno rápidamente se metaboliza a nitritos y nitratos. Los estudios realizados *in vitro* han demostrado que de todas las células que se pueden encontrar en una articulación, los condrocitos son las que sintetizan y liberan los valores más altos de óxido nítrico, y también son los que expresan los valores más altos de ARNm y proteína de sintetisas de óxido nítrico inducible (iNOS) que en dosis alta se convierte en la generadora de

radicales libres que son lesivos para la célula (Blanco García et al., 2000; Sánchez Naranjo et al., 2011).

El NO puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz del cartílago, tales como agreganos. Asimismo, induce la inhibición de la actividad TGF- β . También puede aumentar la actividad de MMP, incrementar la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes (H_2O_2), reducir la síntesis del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1R α), inhibir la proliferación e inducir apoptosis. Por otro lado, recientemente se ha implicado al NO en la formación de osteofitos. Asimismo, se ha observado que el NO puede inducir la mineralización del cartílago en OA por medio de la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Por ello, debido a las propiedades eminentemente destructivas del cartílago articular, el NO puede ser un importante mediador de la lesión articular crónica en la OA (López-Armada et al., 2004).

Por último, las prostaglandinas como PGE2 son mediadores de la inflamación importantes en la estimulación de la vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y contribuyen a la sensibilización del dolor. Asimismo, la PGE2 puede desempeñar un papel clave como mediador de la erosión del cartílago y del hueso yuxtaarticular al incrementar la actividad de MMP de la matriz, importantes mediadores de la degradación tisular. Además, la PGE2 estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular contribuyendo a los fenómenos de angiogénesis (López-Armada et al., 2004). En resumen en la figura 2 se muestran las consecuencias que se producen en los condrocitos producidos por el proceso inflamatorio.

3. Estrés oxidante y antioxidantes

3.1. Definición de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas inestables que contienen oxígeno, altamente reactivas con distintas moléculas en la célula por la presencia de un electrón de valencia no apareado, son de tipo radicales y no radicales,

ilustrados en la figura 3 (Revilla Flores EM, 2021). Se les considera como metabolitos del oxígeno que poseen una fuerte capacidad oxidante, aunque dicha capacidad varía entre las diferentes especies. Del mismo modo, el término ERNO se refiere a un grupo de moléculas conteniendo nitrógeno con diferente reactividad química (Carvajal, 2019).

3.2. Síntesis de las especies reactivas de oxígeno

Los EROs son producidos mediante la respiración celular y otros procesos metabólicos, aunque también pueden generarse por radiación (rayos X, humo de tabaco, contaminación ambiental) (Brieger et al., 2012).

Durante el proceso de respiración celular en las mitocondrias, el oxígeno se reduce por la transferencia sucesiva de electrones individuales y los intermediarios con electrones impares que pueden escapar de la cadena (Brieger et al., 2012). Uno de los principales subproductos es el anión superóxido en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, que da origen a los demás EROs de importancia biológica: peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, radical peroxilo y el oxígeno singulete o individual (Carvajal, 2019).

El peroxisoma cataboliza biomoléculas utilizando enzimas que eliminan el hidrógeno en una reacción oxidativa, creando allí peróxido de hidrógeno (Brieger et al., 2012). Enzimas como xantina oxidasa y óxido nítrico sintetasa las cuales son enzimas citosólicas que además se presentan en procesos inflamatorios, se encargan de producir superóxido y óxido nítrico, respectivamente. En cambio, el citocromo p450 que se encuentra en el retículo endoplásmico, es un complejo responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos, sustratos exógenos y en especial de los compuestos lipofílicos que se convierten en intermediarios reactivos que inician la peroxidación lipídica, ocasionando daño en el DNA y en la membrana microsomal (Corrales et al., 2012).

Dentro de las enzimas que son una de las fuentes mejores conocidas de producción de EROs es considerada la NADPH oxidasa (NOX). NOX está bien

caracterizado por su participación en el proceso de la fagocitosis (Forrester et al., 2018). La NOX es un complejo enzimático unido a la membrana que transfiere electrones del NADPH al oxígeno. Posee una estructura heterodimérica que comprende una subunidad catalítica, NOX, que tiene cinco isoformas conocidas (NOX 1-5). Estas difieren en su distribución tisular y en la cinética de formación de los EROs (Carvajal, 2019).

Las ERO que son generadas como subproductos en los procesos metabólicos y se encuentran en bajas concentraciones, son utilizadas en diferentes procesos fisiológicos vitales. Entre los diferentes procesos celulares que participan están: producción de energía, regulación del crecimiento celular, síntesis de sustancias biológicas (colágeno y prostaglandinas), defensa de tipo inmune (fagocitosis), señalización intracelular y favorecimiento en la quimiotaxis (Corrales et al., 2012).

3.3. Estrés oxidante, lipoperoxidación y daño celular

El estrés oxidante es el desequilibrio entre la generación de ERO y ERNO y los mecanismos antioxidantes en un sistema biológico, donde los primeros sobrepasan la capacidad de las defensas antioxidantes de dicho sistema. Las ERO y las ERNO eventualmente interactúan con estructuras moleculares, tales como ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas, lípidos y carbohidratos, lo que conduce a alteraciones de la actividad de las vías metabólicas y membranas que, sumado a una inadecuada respuesta antioxidante, causa la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis (Espinosa et al., 2019).

El estrés oxidante genera diferentes grados de citotoxicidad que lesiona al ADN, a las proteínas, a los lípidos y a los carbohidratos. Si la severidad del estrés oxidante es muy grande, todas las estructuras celulares importantes (particularmente las mitocondrias y proteínas del citoesqueleto), las macromoléculas (ADN, lípidos, enzimas) y las vías metabólicas se oxidan, se lesionan y posteriormente son bloqueadas o inhibidas, dando lugar a la muerte celular (Montalvo-Javé et al., 2011).

En la membrana celular, las moléculas diana del estrés oxidante son los ácidos grasos poliinsaturados, lo que altera la funcionalidad de la membrana (Montalvo-Javé et al., 2011). Se ha demostrado que la síntesis del óxido nítrico (NO), que es un radical libre del nitrógeno, puede inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana, en este proceso se involucra adicionalmente el anión O_2^- que es una ERO que al interactuar con el óxido nítrico forma peroxinitrito, una molécula precursora de radicales hidroxilo ($^{\cdot}OH$), que se describe como el principal responsable de la lipoperoxidación (Giacopini de Zambrano, 2016).

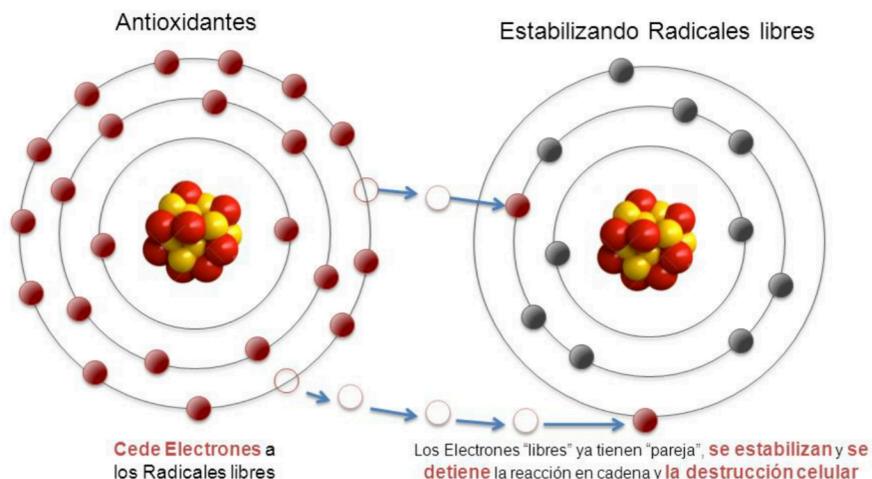
Como consecuencia de la peroxidación en las membranas celulares, inicia un deterioro acumulativo de las funciones membranales y provoca disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad de la membrana. La oxidación causa alteraciones en la estructura de algunas proteínas, modificando su función biológica, estas proteínas inducen daño oxidante y están presentes en enfermedades crónico-degenerativas (Hicks et al., 2006).

3.4. Sistema de defensa antioxidante

Antioxidante es una molécula, donadora de electrones, que es capaz de prevenir o disminuir la oxidación de macromoléculas, removiendo radicales libres o inhibiendo reacciones de oxidación, por lo que la mitigación del daño oxidante (figura 3) representa una estrategia terapéutica como alternativa para reducir el riesgo de muchas patologías asociadas. Además, estimulan el crecimiento celular, que ofrecen soporte al sistema inmunológico y protegen a las células contra el envejecimiento prematuro y anormal (Revilla Flores EM, 2021; Hicks et al., 2006).

Los antioxidantes pueden ser de tipo enzimático y no enzimático. El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar la acumulación de EROs (Corrales et al., 2012). Entre ellos se encuentra:

Figura 3. Reacción química entre los antioxidantes y radicales libres



Nota: Tomado de Ecuvegetal, 2019

3.4.1 Catalasa

Tiene un papel predominante a través del modo catalítico y per-oxidativo. Es capaz de descomponer el H_2O_2 , otorga resistencia ante la toxicidad y daño oxidante, se encuentra en todos los tejidos tiene mayor presencia en el eritrocito e hígado (Revilla Flores EM, 2021).

3.4.2 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) elimina O_2^- convirtiéndolo en H_2O_2 , requiere de cofactores selenio, hierro, cobre, zinc y manganeso, con un nivel adecuado para asegurar una apropiada actividad catalítica. Existiendo 3 formas enzimáticas: asociado a cobre/zinc (CuZnSOD), la cual se encuentra en el espacio citoplasmático intracelular; la asociada a manganeso, que se encuentra en la matriz mitocondrial (MnSOD); y la extracelular (EC SOD), que posee un péptido señalizador que la direcciona hacia el espacio extracelular (Revilla Flores EM, 2021; Corrales et al., 2012).

3.4.3 Enzimas asociadas al glutatión (GSH)

Es una selenoproteína, en presencia de GSH, como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente, utilizando glutatión reducido. El glutatión oxidado es regenerado para poder continuar funcionando y lo hace a través de la enzima glutatión reductasa (Corrales et al., 2012; Carvajal, 2019).

El sistema glutatión incluye: las glutatión S-transferasas, glutatión reductasas y glutatión peroxidasas (GPx), estas últimas divididas en 3 grupos GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 y GPx4/GPx7/GPx8 repartidas en el núcleo, citoplasma, plasma y membrana. Reducen el H₂O₂, peróxido lipídico (LOOH), otros hidroperóxidos orgánicos y xenobióticos (Revilla Flores EM, 2021).

Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas que tienen como función; capturar EROs y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al EROs con el objetivo de estabilizarlo (Corrales et al., 2012).

Dentro de los mecanismos no enzimáticos se incluyen antioxidantes de bajo peso molecular como las vitaminas E y C, la bilirrubina, la biliverdina, el ácido úrico, el ácido ascórbico, el glutatión y los flavonoides (Carvajal, 2019).

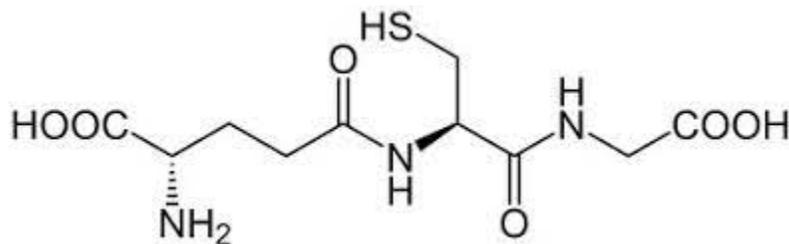
3.5. Glutatión

3.5.1. Significado y estructura

GSH es un tripéptido, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (figura 4), presente en todos los tejidos de mamíferos a concentraciones de 1-10 mM (concentración más alta en el hígado) como el tiol no proteico más abundante que defiende contra el estrés oxidante. El GSH también es un determinante clave de la señalización redox, vital en la desintoxicación de xenobióticos, modula la proliferación celular, la apoptosis, la función inmune y la fibrogénesis (Lu, 2013).

En cuanto a la estructura de GSH esta se describe como un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina. La molécula se encuentra libre y unida a proteínas. A su vez, la fracción libre está integrada por la forma tiol reducida de GSH y la forma oxidada o disulfuro llamada glutatión oxidado (GSSG). La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se encuentra en el interior de las células, en tanto que extracelularmente se encuentran niveles micromolares de GSH. El grupo activo de la molécula está representado por el grupo tiol (-SH) del residuo de cisteína (Denzoin Vulcano et al., 2013).

Figura. 4 Estructura del Glutatión



Nota: Tomado de Mandri, 2017

Las células eucariotas tienen tres depósitos principales de GSH. La mayoría (80–85%) de la GSH celular está en el citosol, 10–15% está en las mitocondrias y un pequeño porcentaje está en el retículo endoplásmico donde se encuentra GSSG (Lu, 2013).

3.5.2. Síntesis de Glutatión

La síntesis de GSH se produce en el citosol de todas las células a partir de sus aminoácidos precursores: glicina, cisteína y ácido glutámico. La síntesis se produce por la acción consecutiva de dos enzimas: glutamato cisteína ligasa (GCL) y glutatión sintetasa (GS). En una primera reacción (I), la GCL usa como sustratos a los aminoácidos glutamato y cisteína y forma el dipéptido g-L-glutamilcisteína que en una segunda reacción (II) es combinado con glicina en

la reacción catalizada por la enzima glutatión sintetasa formando GSH. El ATP actúa como co-sustrato para ambas enzimas (Denzoin Vulcano et al., 2013).

En condiciones fisiológicas normales, la tasa de síntesis de GSH se encuentra determinada en gran parte por dos factores: uno de ellos es la actividad de GCL y el otro es la disponibilidad del sustrato cisteína. Por lo tanto, los niveles intracelulares de GSH son regulados por el feedback negativo del producto final (GHS) sobre la enzima GCL y por la disponibilidad del aminoácido L-cisteína (Denzoin Vulcano et al., 2013).

3.5.3. Funciones protectoras del GSH

Dentro de las funciones que presentan cierta relevancia en este estudio se encuentra el mantenimiento de balance redox intracelular y su actividad como antioxidante, aunque se sabe que es importante para la biotransformación de los xenobióticos y la síntesis de leucotrienos.

La función antioxidante de GSH se logra en gran medida mediante reacciones catalizadas por la peroxidasa de GSH (GPx), que reducen el peróxido de hidrógeno y el peróxido de lípidos a medida que GSH se oxida a GSSG. GSSG a su vez se reduce a GSH por la reductasa GSSG a expensas de NADPH, formando un ciclo redox. Los peróxidos orgánicos también pueden reducirse con GPx y GSH S-transferasa. La enzima catalasa también puede reducir el peróxido de hidrógeno, pero tiene la limitante de estar presente en el peroxisoma. Esto hace que GSH sea particularmente importante en las mitocondrias para defenderse del estrés oxidante generado de manera fisiológica y patológica (Lu, 2013).

El potencial redox intracelular es determinado por GSH. Tanto la concentración de GSH como la relación molar GSH/GSSG contribuyen a mantener el balance redox dentro de la célula. Este equilibrio redox regula diversos procesos metabólicos intracelulares que incluyen la actividad enzimática, el transporte celular, transducción de señales y la expresión génica mediada por la transcripción de factores entre los que se destacan el AP-1, NF κ -B y el p53 (Denzoin Vulcano et al., 2013).

3.6. Métodos para medir el daño oxidante

Las especies oxidantes pueden generar daños en todos los componentes de los sistemas biológicos, incluidos los lípidos, las proteínas y el DNA, estas modificaciones se han relacionado con una amplia gama de patologías. Aunque es probable que algunas de estas sean solo asociaciones (la oxidación no es causal sino simplemente una consecuencia de otros procesos perjudiciales), el daño oxidante parece, al menos en algunos casos, ser un factor contribuyente. Las metodologías que pueden detectar y cuantificar el daño oxidante son, por lo tanto, de considerable importancia, sobre todo como posibles biomarcadores para evaluar estrategias terapéuticas (Hawkins & Davies, 2019).

El daño oxidante puede medirse de forma directa e indirecta:

La forma directa involucra la medición de la concentración de los agentes oxidantes. Durante los últimos años se ha tratado de medir la concentración de agentes oxidantes en el organismo, pero ha resultado difícil en muchos casos, por tener éstos un tiempo de vida media muy corto. El radical hidroxilo tiene una vida de 10^{-10} s. La espectrometría de la resonancia de la rotación (espín) de electrones es la única técnica analítica que miden directamente las EROs, pero su aplicación en el ser humano no es factible aún, además de que son muy caros los equipos necesarios (Pérez Gastell et al., 2000).

El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) es un indicador de especies reactivas que penetra en la célula (también conocido como diacetato de diclorofluoresceína), detecta EROs en las células, por ejemplo, para identificar la generación de intermediarios reactivos de oxígeno en neutrófilos y macrófagos. Tras la disociación de los grupos de acetato por parte de las esterasas intracelulares y la oxidación, el H₂DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente (Thermo Fisher Scientific, 2023).

La medición de oxidantes de forma indirecta cubre una gama diversa dependiendo de qué es de lo que se busca conocer su concentración. Por un lado se encuentran las determinaciones de productos terminales de la acción oxidante, tales como, la peroxidación a través de la medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico: se basa en la reacción del tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Este análisis es usado por su buena practicabilidad y sencillez, pero le falta sensibilidad, por lo que se recomienda, para aumentarla, utilizar procedimientos fluorométricos o cromatográficos (Pérez Gastell et al., 2000).

Otro método indirecto es la medición de la concentración de antioxidantes. Los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar por diferentes enfermedades, por lo que al monitorearlos pueden ser utilizados como marcadores de enfermedades y para el seguimiento terapéutico (Pérez Gastell et al., 2000).

La medición de GSH es factible cuando este reacciona con el ácido ditionitrobenzoico (DTNB) y al reducir el GSSG se puede medir el GSH total (GSH + GSSG). DTNB reacciona con el GSH para producir un anión conjugado y TNB que puede detectarse por fluorescencia o absorbancia. Para medir el GSH total, se utiliza un ensayo de reciclaje en el que el GSH reacciona con el conjugado produciendo GSSG y otra molécula de TNB, que puede aumentar la fluorescencia o la absorbancia (Forman & Rinna, 2009).

4. Cultivo organotípico

4.1. Definición

Los cultivos organotípicos son cultivos de un solo tipo celular que consigue alcanzar una elevada densidad celular, tal y como ocurre en los tejidos. Los cultivos organotípicos constan de varios tipos celulares que interaccionan entre sí

de una forma que intenta parecerse lo más posible a la original. Los cultivos organotípicos constituyen la base de una nueva disciplina denominada ingeniería de tejidos (Universidad del País Vasco, 2010).

Las construcciones organotípicas 3D basadas en células humanas proporcionan sistemas de prueba directamente aptos para respaldar el cambio regulatorio de la dependencia estricta de los modelos animales para la predicción de los efectos en la salud humana medidos por la interrupción de las vías metabólicas celulares críticas (Hayden & Harbell, 2020).

4.2. Elaboración de cultivos organotípicos

Décadas anteriores, se han desarrollado construcciones de cultivo 3D en el cual se requiere una matriz o sustrato que no sea el poliestireno muy rígido de los recipientes de plástico de cultivo de tejidos estándar. La matriz también puede proporcionar desencadenantes esenciales para la expresión de fenotipo organotípico. Uno de los primeros ejemplos de tal matriz fue Matrigel. Para producir el cultivo organotípico, las células se incrustan en un andamio de Matrigel y luego la construcción se cubre con un medio que contiene los factores de crecimiento y diferenciación apropiados y citocinas para promover la diferenciación y expansión (Hayden & Harbell, 2020).

4.3. Ventajas y Desventajas frente al modelo 2D o cultivo celular

Los sistemas 2D se diseñaron para centrarse en la replicación para la expansión de la población, lo que a menudo impedía la retención del fenotipo diferenciado. Se encontró que las células no tumorigénicas requieren unión a un sustrato (es decir, plástico o vidrio) para proliferar en cultivo (denominado crecimiento dependiente del anclaje) en contraste con las células tumorigénicas que pueden crecer sin unión en agar blando (anclaje independiente). El desarrollo de sustratos no rígidos que apoyaron el crecimiento dependiente del anclaje fue un gran paso adelante en la tecnología de organotípicos (Hayden & Harbell, 2020).

Los cultivos de líneas celulares tienen una desventaja más, a parte de la pérdida de diferenciación; también presentan la pérdida de muchas características importantes específicas de órganos y atributos funcionales que los investigadores esperaban estudiar. De acuerdo con la investigación que se pretenda se tiene la necesidad de mantener la naturaleza y la arquitectura 3D del sustrato sobre el cual o en el cual se cultivan las células, pistas físicas y mecánicas del sustrato, además de las interacciones célula-célula (Hayden & Harbell, 2020).

En el caso del cultivo organotípico, una de las grandes ventajas es que permite tener del mismo órgano diferentes tejidos para hacer diferentes tratamientos experimentales. El problema fundamental es que aunque permiten hacer muchos experimentos y un análisis óptico sencillo, la viabilidad y la manipulación experimental es difícil. Tanto este cultivo como la manipulación del mismo introducen un cierto artefacto y no se pueden cultivar a largo plazo (Da Silva, 2022).

4.4. Importancia del cultivo organotípico

Los cultivos tienen que ser representativos de la situación *in vivo*, fáciles de manipular y baratos. Para poder conseguir estas características se hacen compensaciones para obtener los resultados pertinentes. Entonces, por un lado, primero hay que identificar el objetivo del cultivo (trasplantes o investigación) y luego se deben identificar las compensaciones para alcanzar dicho objetivo. De manera que los cultivos cuyo objetivo final sea el trasplante, deberán ser grandes y partir de mucho más tejido inicial. Además, tendrán que ser tratados para que la respuesta inmune a este injerto sea mínima. Mientras que los cultivos para hacer screening de drogas (otra finalidad diferente), deben ser bastante pequeños para que quepan en una placa multipozos y predecir los resultados de ensayos clínicos y no tendrían que ser tratados con agentes que eliminen el sistema inmune.

Los factores a considerar para adaptar el cultivo son:

- El rendimiento que requiere el ensayo
- La facilidad de las manipulaciones moleculares
- La facilidad de las lecturas moleculares

- La recapitulación necesaria de la histología *in vivo*
- La disponibilidad de células y tejidos primarios para ese órgano específico

Para conseguir una gran recapitulación de la histología *in vivo*, los modelos de cultivo embebidos (3D) más complejos son los más adecuados.

Por otro lado, si los cultivos involucran tejidos humanos primarios deben usarse eficientemente los materiales de partida ya que son limitados. Y por último, si la imagen óptima es crucial, el cultivo 3D debe ser relativamente delgado y transparente para poder llevarla a cabo (Da Silva, 2022).

5. Nanotecnología

5.1. Definición

Se hace referencia a la nanociencia como el estudio de las relaciones entre las propiedades físicas y las dimensiones de los materiales en la escala nanométrica. La nanotecnología puede diseñarse como equipo para el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras y nanomateriales. La nanociencia y la nanotecnología incluyen la idea de observar y controlar átomos y moléculas individuales. La era de la nanotecnología ha evolucionado con el desarrollo de herramientas precisas como el microscopio de efecto túnel y el microscopio de fuerza atómica (Pradhan & Chakraverty, 2021).

5.2. Nanoestructura

5.2.1. Definición

El prefijo “nano” proviene del griego (νάνος), que significa “enano”, incorporado al español como prefijo que entra en la formación de nombres y adjetivos con el significado de ‘muy pequeño’, y que en el campo de las nanociencias representa la mil millonésima parte de algo. Por lo tanto, describe a aquellas partículas que son más pequeñas que 1000 nanómetros (Márquez Durán et al., 2021).

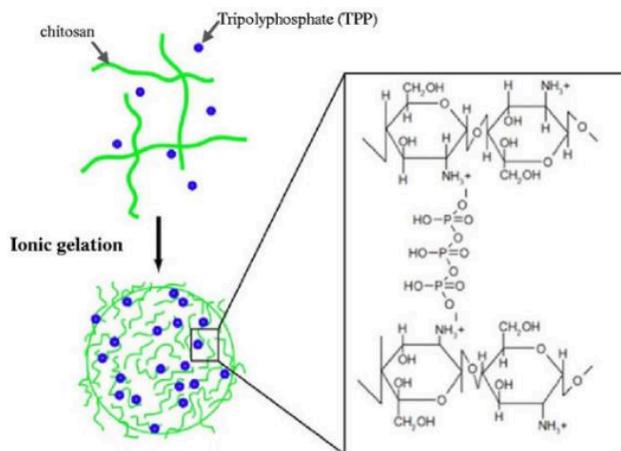
5.2.2. Nanopartículas de quitosán

5.2.2.1. Composición y estructura

El quitosano es un amino polisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. Químicamente, el término quitosano define a una familia de heteropolisacáridos lineales que están formados por 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (unidades D) y 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa (unidades A) unidas en (1&4). Las unidades de tipo A a menudo están presentes en menor proporción que las de tipo D, y su contenido, expresado como la relación molar de unidades A frente al total (A+D), se conoce como el grado de acetilación que se expresa como porcentaje (GA) o como una fracción (FA). Junto al grado de polimerización, el GA es un parámetro fundamental que determina directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano (Goycoolea Valencia et al., 2009; Márquez Durán et al., 2021).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano 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 quitosano 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 (Goycoolea Valencia et al., 2009).

Figura 5. Formación del complejo quitosán-tripolifosfato por reticulación ionotrópica



Nota: Tomado de Valenzuela de León, 2020.

5.2.2.2. Proceso de fabricación

Existe una variedad de métodos para la síntesis de nanopartículas de quitosán (QNP) que se ajustan a las necesidades del fabricante; sin embargo, sólo unos cuantos de éstos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos. Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación iónica del quitosano utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP) ilustrado en la figura 5 (Goycoolea Valencia et al., 2009).

Actualmente, los QNP se sintetizan utilizando un método de gelificación iónica en el que se prepara la solución de un reticulante aniónico, por ejemplo, TPP y Q donde ambos reactivos se autoensamblan en QNP debido a la interacción electrostática entre el grupo amino cargado positivamente de Q y un polianión cargado negativamente como TPP. Si bien se pueden emplear varios agentes reticulantes aniónicos como el glutaraldehído para la síntesis de QNP, el uso de TPP es más favorable porque es biocompatible y biodegradable. Se demostró que

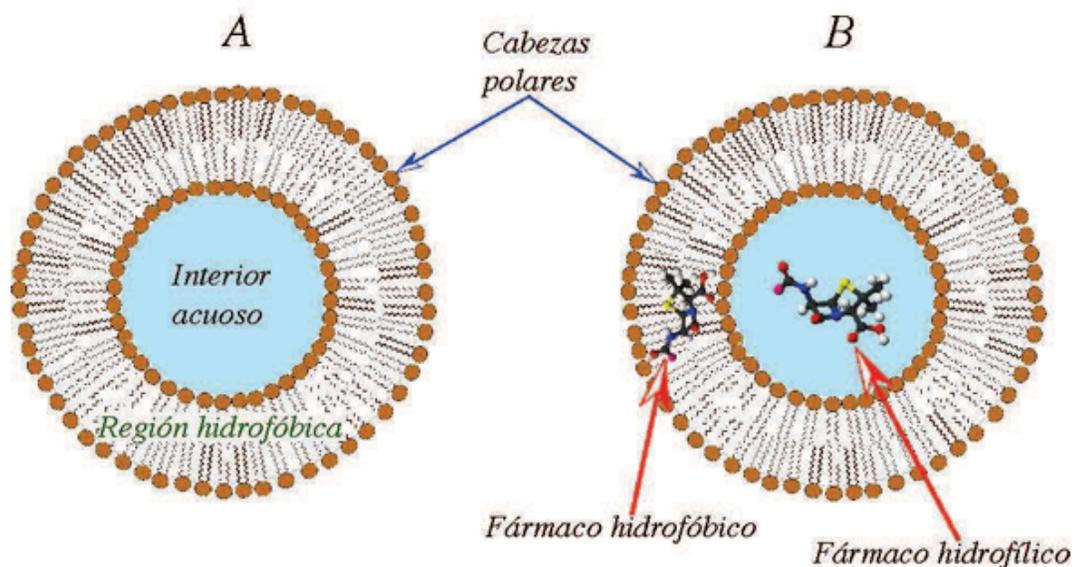
el tamaño de las NP, el diámetro hidrodinámico, la forma y la monodispersidad están influenciados por el PM de Q, las concentraciones iniciales de TPP y Q, la relación de masa Q: TPP, el grado de acetilación de Q y el pH de la reacción (Rizeq et al., 2019).

5.2.3. Liposomas

5.2.3.1. Composición y Estructura

Los liposomas se pueden definir como vesículas en forma de esfera compuestas por fosfolípidos anfifílicos y colesterol. Los fosfolípidos anfifílicos forman una bicapa cerrada que encapsula los componentes del medio acuoso y está en contacto con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos de membrana. El uso de esta tecnología en el desarrollo de medicamentos también encuentra gran utilidad en fármacos altamente hidrofóbicos que podrían encapsularse para potenciar su actividad farmacológica y sacar provecho de las características propias del sistema liposomal, como se representa en la figura 6 (Rodríguez-Hernández et al., 2018).

Figura 6. Estructura de los liposomas



Nota: Tomado de Bayas y Brito, 2009

Existe una clasificación de acuerdo a la estructura, composición y tamaño de los liposomas, en los cuales se divide a los liposomas unilamelares en liposomas unilamelares pequeños (SUV), medianos (MUV), grandes (LUV) o gigantes (GUV) (CIATEJ, 2017).

La medida de los SUV se encuentran entre 15-100 nm, y su preparación es por sonicación de punta o bien por extrusión. Este método de sonicación debe ser utilizado cuando las moléculas no sean susceptibles a degradación por fricción o por calentamiento. El tamaño de los liposomas MUVs oscila entre 100-500 nm, los cuales se obtienen regularmente a partir de una sonicación de baño; este método de sonicación es más recomendado debido a que la solución no se contamina por el titanio de la punta de sonicación. Los LUVs se consideran aquellos liposomas que miden entre 500 y 1,000 nm; estos al igual que los MUVs, se preparan a través del baño de sonicación y por extrusión. Estos liposomas son los más socorridos para el encapsulamiento de moléculas activas, sin ser considerados como nanoliposomas. Los GUVs son todos aquellos liposomas que se encuentran por arriba de una micra y estos son utilizados generalmente en estudios físicos y químicos que se llevan a cabo sobre la membrana celular, debido a la curvatura e interacción interfacial que tiene la superficie lipídica comparada con la curvatura de la membrana celular. Los GUVs son preparados utilizando una técnica de rehidratación de bicapa (CIATEJ, 2017).

5.2.3.2. Proceso de fabricación

En la mayoría de las técnicas se disuelven los fosfolípidos en un solvente orgánico para después proseguir con la eliminación de dicho solvente. La disolución previa seguida de la eliminación del solvente orgánico es importante para la formación de los liposomas. Principalmente, los liposomas se componen por fosfolípidos y/o colesterol; los fosfolípidos usan el rango nanomolar, lo que refiere a la concentración micelar crítica; en cambio, la concentración de fosfolípidos usados para la fabricación de liposomas está muy por encima de la concentración micelar crítica. Lo anterior influye en la formación del cilindro tridimensional de cada

fosfolípido que concluye en la formación de liposomas junto con agregados de lípidos cuando los fosfolípidos se exponen a un entorno acuoso (Shah et al., 2020).

Para realizar las dispersiones liposomales uniformes, se deben exponer las láminas lipídicas a una fase acuosa o introducir la solución de fosfolípidos orgánicos de manera controlada en un ambiente acuoso para la formación de liposomas. Esta es la razón por la cual todas las técnicas informadas se enfocan primero en desagregar los fosfolípidos individuales, seguido de la exposición a un ambiente acuoso para permitir la formación de diferentes tipos de liposomas según su tamaño (Shah et al., 2020). Las técnicas informadas se hacen de la siguiente manera:

Evaporación de disolvente: también conocida como hidratación de película lipídica, los fosfolípidos se disuelven en un solvente orgánico (más a menudo una mezcla equimolar de cloroformo y metanol, otros pueden ser éter, etanol o diclorometano). El fármaco, si es lipófilo, también se añade al disolvente orgánico para formar una solución monofásica. Posteriormente, el disolvente orgánico se elimina lentamente al vacío para formar láminas delgadas de películas lipídicas en las que el fármaco se dispersa uniformemente. Las láminas delgadas de lípidos se hidratan con una fase tampón acuosa por encima de la fase de transición vítrea del lípido. Si el fármaco es hidrofílico, debe disolverse en la solución tampón acuosa. La dispersión resultante da MUV con un tamaño de partícula en el rango de micrómetros. Esta técnica también es más adecuada para fármacos lipofílicos ya que se puede obtener una alta eficiencia de atrapamiento (>90%). Para las drogas hidrofílicas, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas, la eficiencia de atrapamiento rutinariamente sería de alrededor del 10-30% por este pasivo proceso (Shah et al., 2020).

Dispersión de solvente: los fosfolípidos se disuelven en un disolvente orgánico que suele ser miscible con agua, siendo el etanol el disolvente preferido. Un fármaco lipófilo se disolvería en la solución etanólica junto con los fosfolípidos (podrían utilizarse otros disolventes miscibles en agua si el fármaco lipófilo no es soluble en etanol). La solución etanólica de fosfolípido/fármaco se añade a una solución

tampón acuosa, lo que lleva a la dilución del etanol en el agua y, por lo tanto, a la formación espontánea de MUV. Esta técnica es más adecuada para fármacos lipofílicos, que pueden producir una alta eficiencia de atrapamiento (Shah et al., 2020).

Evaporación de fase inversa: es la técnica más preferida para cargar un fármaco hidrofílico en liposomas. Se prepara disolviendo el fármaco hidrófilo en agua y disolviendo el fosfolípido en un disolvente inmiscible en agua (normalmente cloroformo). A continuación, se elimina lentamente el disolvente orgánico al vacío, y se forma una fase de gel. La evaporación adicional del solvente orgánico produce una dispersión liposomal con un alto atrapamiento del núcleo acuoso en el núcleo interno de los liposomas (Shah et al., 2020).

Para conseguir una elevada proporción fármaco-lípido mientras se retiene la estabilidad fisicoquímica a largo plazo, se emplea un método de liofilización para obtener un polvo de fármaco lípido seco, que se rehidrata en una solución acuosa inmediatamente antes de su uso (Márquez Durán et al., 2021).

III. Justificación

La osteoartritis es la enfermedad más frecuente en los adultos de la tercera edad y ha sido relacionada con el estrés oxidante. De acuerdo con datos y cifras actuales en 2019, alrededor de 528 millones de personas en todo el mundo tenían osteoartritis; se tuvo un aumento del 113% desde 1990, además alrededor del 73% de las personas con osteoartritis son mayores de 55 años y el 60% son mujeres.

La articulación de la rodilla es la más afectada con mayor frecuencia, con una prevalencia de 365 millones, seguida de las articulaciones de la mano y cadera. Con el envejecimiento de la población y el aumento de las tasas de obesidad y traumatismos, se prevé que la prevalencia de la osteoartritis continúe aumentando a nivel mundial (World Health Organization: WHO & World Health Organization: WHO, 2023).

IV. Planteamiento del problema

La osteoartritis es una enfermedad que se desarrolla principalmente en el cartílago articular, en el cual los condrocitos presentan diversas funciones para preservar el microambiente y al verse alterada su homeostasis provoca el deterioro en el cartílago que causa la OA.

De acuerdo con trabajos anteriores en donde se utilizó como modelo de estudio el cultivo celular primario de condrocitos para evaluar sistemas nanoparticulados con antioxidantes, surge la necesidad de utilizar el modelo de cultivo organotípico para comparar los resultados obtenidos considerando las bondades de ambos modelos experimentales. El cultivo organotípico representa un tipo de cultivo celular que permite mantener los tipos celulares diferenciados en este caso que conforman al tejido de origen.

Por lo tanto la pregunta es: ¿Se producirá diferente respuesta entre los nanosistemas con capacidad antioxidante expuestos al modelo de cultivo organotípico de cartílago de rata wistar?

v. Hipótesis

La exposición de dos sistemas nanoestructurados en cultivos organotípicos de cartílago de *Rata Wistar*, modificarán significativamente el estado redox celular y su capacidad antioxidante podrá ser evaluada.

VI. Objetivos

Objetivo General

Analizar y comparar el efecto de dos sistemas nanoestructurados con capacidad antioxidante en cultivos organotípicos de cartílago de *Rata Wistar*, a través de la medición de biomarcadores de estrés oxidante.

Objetivos Específicos

- Preparar y caracterizar a los liposomas y nanopartículas, en cuanto a porcentaje de encapsulación del GSH, tamaño de partícula y potencial Z.
- Determinar la viabilidad celular, a través de la medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa, por medio de un método colorimétrico.
- Medir los niveles de glutatión intracelular y extracelular por el método de DTNB, por un método colorimétrico.
- Estimar los niveles de especies reactivas de oxígeno por la técnica de 2,7-diclorofluoresceína, por un método fluorométrico.
- Cuantificar los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico por la técnica de TBARS, a través de un método colorimétrico.

VII. Metodología

Las nanopartículas se prepararon de acuerdo a la metodología realizada por López et al. 2019 y los liposomas se prepararon de acuerdo a la metodología propuesta por Granados 2023.

❖ Preparación de Nanopartículas de quitosán y GSH

La síntesis de nanopartículas de quitosán se realizó a partir del método de gelación iónica. Se preparó la solución de ácido acético al 1% a pH 4.1 - 4.2 que posteriormente se usa para disolver Pluronic F-68 con quitosán de bajo peso molecular (solución 1) y a parte tripolifosfato al 0.1% en solución ácida al 1% (solución 2). Ambas soluciones se filtraron y después se agregó GSH reducido a la solución 1. Por último, se incorporaron ambas soluciones por goteo constante mientras se mantenía agitación constante utilizando el agitador magnético extraplano IKA y se filtraron usando membranas de 0.65 μm y 0.45 μm para esterilizarlas.

❖ Preparación de Liposomas de colesterol y GSH

De acuerdo al protocolo de liposomas se disolvió L- α -fosfatidilcolina de soya en etanol utilizando el agitador magnético extraplano IKA. Posteriormente se agregó el colesterol junto a una mezcla 1:1 de cloroformo y metanol. Se mezclaron en el rotavapor BUCHI R-100, mientras se preparaba la solución de sacarosa al 10% en la cual se adicionó GSH. Ambas soluciones se mezclaron en el rotavapor y se sonicaron en el baño ultrasonido ELMA S30H. Por último, se filtraron usando membranas de 0.65 μm y 0.45 μm para esterilizarlas.

❖ Preparación de cultivo organotípico

De acuerdo con lo realizado en el laboratorio, se obtuvo el cartílago hialino de las costillas de Rata Wistar de entre 4 a 6 semanas de vida y se realizaron lavados con buffer de Krebs - Henseleit (D-glucosa, sulfato de magnesio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y bicarbonato de sodio). En el vibratomo Leica VT1200 se realizaron los cortes y se

mantuvieron en el buffer de disección (cloruro de calcio, D-glucosa, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, bicarbonato de sodio, sucrosa y rojo de fenol) hasta que se repartieran en la placa organizados en base a la tabla 2 .

La prueba fue aprobada por el CICUAE-FESC con clave C 23_31

Tabla 1. Condiciones del cultivo organotípico de cartílago

Parámetro	Condiciones
Cortes	Vibratomo Leica VT1200 a velocidad de 0.4 mm/s y 100 µm de cada corte 5 cortes por pozo
Incubación	Incubadora Shel Lab CO2 Incubator a CO: 5% y temperatura: 37 °C
Medio	Medio DMEM suplementado y antibiótico al 1%

Terminado el tiempo de incubación se almacenaron los cortes en buffer de lisis (0.05% de tritón, 100 mM de PMSF stock y 5mM EDTA) por un mínimo de 72 hrs en el congelador. Después se disgregó el tejido usando el homogeneizador de muestras y se realizaron las pruebas experimentales, las condiciones del procesamiento de la muestra se encuentran en forma de resumen en la tabla 1.

Tabla 2. Esquema de exposiciones

No.	Tratamiento	Condiciones
1	Control positivo	Peróxido de hidrógeno a 100 µM Tiempo de exposición: 30 minutos
2	Control negativo	Medio DMEM suplementado Tiempo de exposición: 2 horas
3	Nanopartículas vacías a menor volumen	

4	Nanopartículas de GSH a menor volumen	Volumen: 1 µL Tiempo de exposición: 2 horas
5	Liposomas vacíos a menor volumen	
6	Liposomas de GSH a menor volumen	
7	Nanopartículas vacías a mayor volumen	Volumen 10 µL Tiempo de exposición: 2 horas
8	Nanopartículas de GSH a mayor volumen	
9	Liposomas vacíos a mayor volumen	
10	Liposomas de GSH a mayor volumen	

Prueba de viabilidad

Terminado el tiempo de exposición en una placa Elisa se tomó con micropipeta cada tratamiento y se agregó PBS 1:1. Posteriormente, se adicionó el reactivo lactato deshidrogenasa (LDH) previamente preparado. Por último se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se obtuvo la lectura en el lector de placas a 495 nm de acuerdo al inserto del Kit Roche Diagnostics GmbH de detección de citotoxicidad / Roche Ref. 11644793001.

Porcentaje de encapsulamiento

En la siguiente prueba se tomaron dos tubos eppendorf siendo el primero para el análisis de nanopartículas y el segundo para liposomas. Se agregó glicerol al 99% en el fondo de ambos, en el caso de nanopartículas se adicionó el ácido acético al 1% mientras que en el tubo de los liposomas se utilizó sacarosa al 10%. A continuación, teniendo el tubo eppendorf con el medio que corresponde a cada uno de los nanosistemas se agregaron las NP's Q - GSH / LP V - GSH. El

siguiente paso fue la incorporación hasta el borde del tubo ácido acético al 1% para nanopartículas y sacarosa al 10% al tubo correspondiente a los liposomas.

Por último, se centrifugó a 13000 rpm en microcentrifuga con control de temperatura (Microfuge 22R Centrifuge Beckman Coulter) durante 1 hora a 4°C y se tomó una alícuota del sobrenadante y se leyó por triplicado su absorbancia en el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. Después se calculó el porcentaje de encapsulamiento a partir de la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{(\text{Concentración del GSH teórico} - \text{Concentración del GSH no encapsulado})}{\text{Concentración del GSH teórico}} * 100$$

Cuantificación de EROs

Antes de comenzar la prueba se mantenía el área de trabajo a oscuras para evitar interferencias con el reactivo Diclorofluoresceína. Primero, se preparó en la Campana de flujo laminar modelo CFV-90 el antibiótico al 1%, medio blanco estéril y 10 mM DFC. Después se agregó lo anterior a los pocitos donde previamente se les extrajo el medio quedando únicamente los cortes que se mantuvieron en incubación para llevar a agitación a 55 rpm en el agitador orbital labnet S2030 IS. Por último, se tomó el medio donde permanecían los cortes para pasarlo a una celda y realizar su posterior lectura en el fluorómetro Beckman a una longitud de 498 nm de excitación y 522 nm de emisión de acuerdo con lo reportado en Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri (2015).

Cuantificación de GSH

Esta prueba se realizó con dos muestras: los cortes del cartílago y el medio siendo estos experimentos independientes. Para esto, se tomó la muestra y se agregó ácido sulfosalicílico al 5% dejándolo en refrigeración por 15 minutos. Se llevó a centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm a 4°C y posteriormente se tomó el sobrenadante para agregarle el buffer de reacción: DTNB (0.52 mM), EDTA (6×10^{-3} M) y PBS. Por último, se incubó por 20 minutos a 37°C y se leyó a 450 nm en el espectrofotómetro.

Cuantificación de TBARS

Se tomó la muestra del corte de cartílago y adicionó ácido perclórico 2.5% para después enfriarlo por 20 minutos y agregar PBS. Después se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante para agregar en un tubo eppendorf TBA. Se incubó a 90°C por 30 minutos y depositó la solución en los pozos. Por último, se leyó a 540 nm en el lector de placas.

Caracterización de partícula

La presente prueba se realizó en colaboración con compañeros que participan en dicho proyecto. Para esta prueba se utilizaron los nanosistemas en solución y el equipo Malvern Nano ZS Zetasizer que se encontraba conectado a un programa informático en el cual se obtuvieron los resultados por medio de gráficos tanto para el potencial z como el tamaño de partícula.

Para la preparación de la muestra en la prueba del tamaño de partícula se tomó una celda donde se depositó la solución llenando por lo menos 1 cm de esta cuidando de no tener residuos de pelusa en las paredes y que al introducirlo en el equipo la flecha que se encuentra en la celda deba estar enfrente.

En el caso del potencial z en una celda limpia se agregó la muestra usando jeringa evitando hacer burbujas y se utilizó una tapa para después colocarlo en el equipo donde fue analizado.

Análisis Estadístico

Durante el desarrollo de las pruebas experimentales se realizaron cuatro experimentos independientes por triplicado cada una; para el análisis estadístico se utilizó el programa OriginPro 2023. Los resultados de los datos se expresan como promedio de cada tratamiento en el cual se utilizó ANOVA de una vía. También se realizó el modelo de Fisher LSD para comparar las medias de dichos resultados entre los diferentes tratamientos con $p < 0.05$.

VIII. Resultados y discusión

Porcentaje de encapsulamiento

Posterior a la fabricación de los nanosistemas se realizó la primera prueba con el fin de confirmar que dentro de los nanosistemas se encuentra glutatión.

El porcentaje de encapsulamiento de GSH es un método indirecto que mide la cantidad de antioxidante dentro de las nanoestructuras. Los resultados de esta prueba se encuentran en la tabla 3 indicando que en los liposomas y nanopartículas se encuentra 97% - 99% del antioxidante encapsulado y el GSH libre es menor en comparación.

Tabla 3. Porcentaje de encapsulamiento de GSH y determinación de partícula para liposomas y nanopartículas.

Tratamiento	% Encapsulamiento de GSH		Caracterización de partícula	
	Promedio	Desviación estándar	Tamaño	Potencial Z
Liposomas	97.95	± 0.29	493.4 nm	-8 Vm
Nanopartículas	99.59	± 0.06	272.9 nm	23 Vm

Por lo tanto, las nanoestructuras que se introdujeron en el cultivo organotípico se encuentran cargadas en su mayoría con el antioxidante de interés.

En el caso del tamaño de partícula, Rizeq B. R. et al. (2019) explican que el tamaño inferior a 500 nm de las nanopartículas les permite ingresar a células y orgánulos, ofreciendo enfoques innovadores como la administración dirigida de fármacos, por esa razón es relevante su determinación ya que permite dilucidar que ambos sistemas pudieron entrar a la célula.

Viabilidad

Continuando con las pruebas previas a la exposición en el cultivo organotípico se encuentra la prueba de viabilidad que consiste en detectar a la enzima citoplasmática, lactato deshidrogenasa, que se libera de la célula por lo que se considera un biomarcador asociado a la muerte celular de acuerdo al inserto del kit Roche Diagnostics GmbH.

La elección de estresor se basa en que el peróxido de hidrógeno en la célula es conocido por formar radicales de oxígeno porque su estructura es sumamente inestable lo que ocasiona la formación de intermediarios que pueden causar daños en organelos incluso en el material genético (Revilla Flores EM, 2021).

Por lo cual se evaluó el efecto citotóxico del peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones como se indica en la tabla 4. Por un tiempo de exposición de 30 minutos.

Tabla 4. Concentraciones de los tratamientos del peróxido de hidrógeno para la prueba de viabilidad

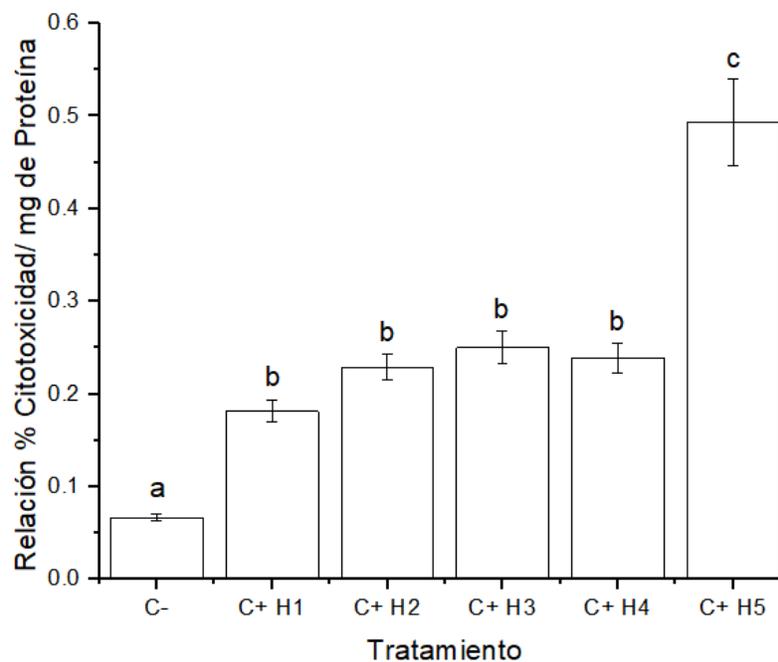
Tratamiento	Concentración de peróxido
C -	0 μ M sin tratamiento
C +	50 μ M
	100 μ M
	300 μ M
	600 μ M
	900 μ M

El control negativo representa las células no tratadas que en los resultados de la gráfica 1 se observa como el de menor porcentaje de citotoxicidad; en cambio, para los tratamientos 50, 100, 300 y 600 μ M los resultados no mostraron diferencias significativas entre ellos y para la concentración de 900 μ M sí mostró

diferencia significativa con respecto a las demás concentraciones y con respecto al control negativo. Por lo tanto, para el control positivo se eligió la concentración 100 μM ya que el peróxido de hidrógeno a esa concentración es capaz de ejercer su efecto estresor sin afectar de forma irreparable a las células.

Es relevante mencionar que para este estudio el tiempo de exposición en el cultivo organotípico es de dos horas y como la exposición que se destina es aguda se busca que esta tenga un efecto evitando la muerte celular total en la muestra.

Gráfica 1. Prueba de viabilidad por el método de LDH.



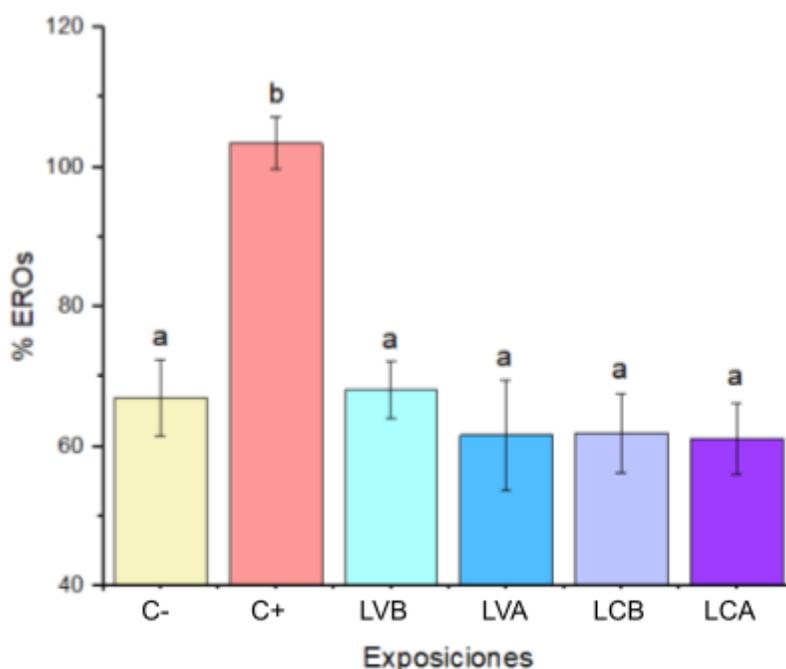
Nota: Resultado del efecto citotóxico en el tejido en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Fisher $p < 0.05$). Cada tratamiento tiene la siguiente concentración: C- 0 μM ; C+ H1 50 μM ; C+ H2 100 μM ; C+ H3 300 μM ; C+ H4 600 μM ; C+ H5 900 μM

%EROs

Después de las dos horas de incubación del cultivo de cartílago de rata Wistar se realizó la primera prueba de porcentaje EROs que consistió en la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno producidas en el tejido y usando el reactivo DCF para su identificación (Pérez Gastell et al., 2000).

Los resultados de los controles demuestran que para el control negativo existe un porcentaje de especies reactivas inferior (menor al 70%) comparado con el control positivo al cual se adicionó el estresor peróxido de hidrógeno a una concentración de 100 μ M con el fin de producir estrés celular.

Gráfico 2. Cuantificación de %EROs en liposomas



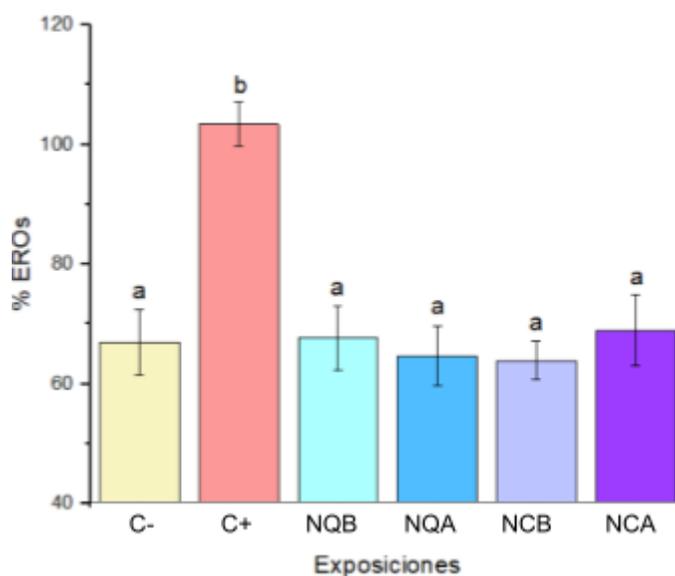
Nota: Resultado del porcentaje de especies reactivas de oxígeno en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), LVB (Liposomas vacíos de baja concentración), LCB (Liposomas con GSH de baja concentración), LVA (Liposomas vacíos de alta concentración) y LCA (Liposomas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

Como se ilustra el gráfico 2, se observa la diferencia significativa existente entre el control positivo y los demás tratamientos que corresponden a los liposomas manteniéndose en resultados similares junto al control negativo. Una respuesta parecida ocurre con las nanopartículas representadas en el gráfico 3.

Debido a que en ambos nanosistemas la respuesta no representa diferencias significativas, se puede sugerir que su vectorización no indujo estrés a la célula, lo cual puede deberse a su tamaño así como al glutatión presente en los liposomas como en las nanopartículas (Rizeq B. R. et al. 2019; Denzoin Vulcano et al., 2013).

También, se conoce que de las vías más conocidas y estudiadas para la entrada de los nanosistemas al interior de las células, están los mecanismos activos de internalización: endocitosis, macropinocitosis, fagocitosis y pinocitosis (siendo ésta última la más común). Estos mecanismos los encapsulan en vesículas selectivamente transportadas y se estima que en cada mecanismo está involucrado el tamaño de la partícula, su carga superficial, así como la maquinaria de transporte. Sin embargo, se sabe también que existen mecanismos pasivos de internalización en células que no presentan mecanismos de endocitosis (Rodríguez-Hernández et al., 2018).

Gráfico 3. Cuantificación de %EROs en nanopartículas



Nota: Resultado del porcentaje de especies reactivas de oxígeno en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), NQB (Nanopartículas vacías de baja concentración), NCB (Nanopartículas con GSH de baja concentración), NQA (Nanopartículas vacías de alta concentración) y NCA (Nanopartículas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

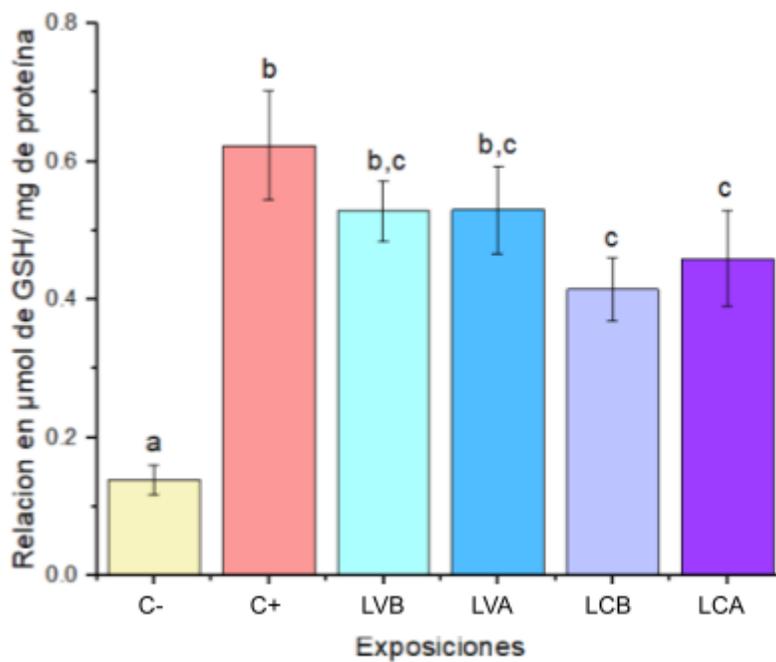
GSH en el tejido

En la prueba de glutatión en el tejido se utiliza el buffer de reacción que contiene DTNB que reacciona con el glutatión oxidado para obtener el glutatión total

presente en la muestra. El GSH en el tejido es el antioxidante introducido en el cartílago a partir de nanopartículas y liposomas (Forman & Rinna, 2009).

En primera instancia, el control negativo muestra los niveles basales de GSH en las células sin tratamiento; por el contrario, el control positivo muestra un incremento en los niveles de GSH de las células expuestas al agente estresor, como se mencionó anteriormente debido al ser una especie reactiva de oxígeno genera la síntesis de dicho antioxidante endógeno en respuesta a los mecanismos reguladores de estrés oxidante.

Gráfica 4. Cuantificación de Glutación intracelular liposomas



Nota: Resultado de la cuantificación de GSH intracelular en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), LVB (Liposomas vacíos de baja concentración), LCB (Liposomas con GSH de baja concentración), LVA (Liposomas vacíos de alta concentración) y LCA (Liposomas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

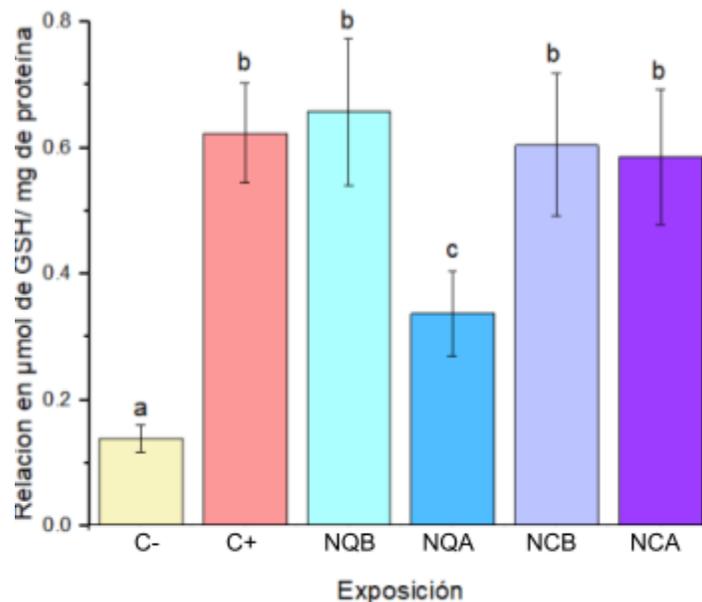
Por otro lado, en la gráfica 4 se muestran los resultados para liposomas, siendo que no hay diferencias significativas entre los liposomas cargados y los vacíos, sin embargo en los liposomas cargados se puede observar un menor nivel, esto implica que la exposición las células a estos nanosistemas pudieran estar

activando una respuesta celular en los liposomas vacíos y en el caso de los liposomas cargados pudiera ser debido a la concentración de GSH dentro de ellos.

Los liposomas están formados por colesterol y fosfatidilcolina que pueden encontrarse normalmente en la membrana celular por lo que las interacciones que ocurren entre los liposomas y las células puede ser que aumenten las concentraciones de GSH a nivel celular (Batalla Mayoral et al., 2014).

En los resultados de nanopartículas encontrados en el gráfico 5 se puede observar que NQB, NCB y NCA presentan resultados similares al control positivo, incrementando los niveles de glutatión mientras que NQA mostraron resultados similares a los observados en los liposomas.

Gráfica 5. Cuantificación de Glutatión intracelular nanopartículas



Nota: Resultado de la cuantificación de GSH intracelular en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), NQB (Nanopartículas vacías de baja concentración), NCB (Nanopartículas con GSH de baja concentración), NQA (Nanopartículas vacías de alta concentración) y NCA (Nanopartículas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

De acuerdo con los anteriores resultados, se encontró cierta predisposición entre los liposomas y nanopartículas de concentración baja. En cambio, ocurre lo contrario para las nanopartículas de concentración alta.

Por dicha inclinación, se sugiere que el origen del GSH encontrado es endógeno, es decir, producido en el interior de la célula ya que esto explicaría porqué los nanosistemas vacíos se encuentran con concentraciones de GSH mayores en comparación con las que están cargadas con el antioxidante.

En el caso de los cargados, debido a la presencia de glutatión en los nanosistemas, se podrían estar activando mecanismos de regulación a nivel celular para la síntesis del glutatión, ya que a nivel celular grandes actividades de este antioxidante inhiben la actividad de la enzima GCL esto puede ser parte de la respuesta del tejido a la entrada de los nanosistemas como mecanismo de regulación para la síntesis de glutatión (Rodríguez-Hernández, 2018; Denzoin Vulcano et al., 2013).

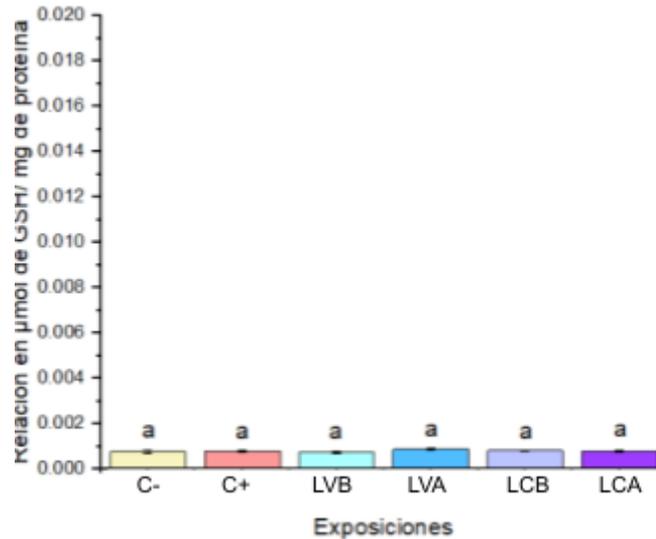
También hay que considerar que el cartílago está compuesto por matriz extracelular y condrocitos lo cual podría en algún momento atrapar alguno de los nanosistemas e impedir que entre a las células y la liberación del antioxidante sea menor.

GSH en el medio

Por otro lado se midieron también los niveles de GSH en el medio, con el objetivo de corroborar si el glutatión medido anteriormente era debido a una respuesta por parte de la célula o por el glutatión presente en los nanosistemas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fracción presente en el medio, no se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ni en los sistemas de liposomas, ni en los sistemas de nanopartículas (gráficos 6 y 7 respectivamente) lo cual sugiere que los nanosistemas lograron entrar y los niveles de GSH intracelular pueden ser los contenidos en ellos.

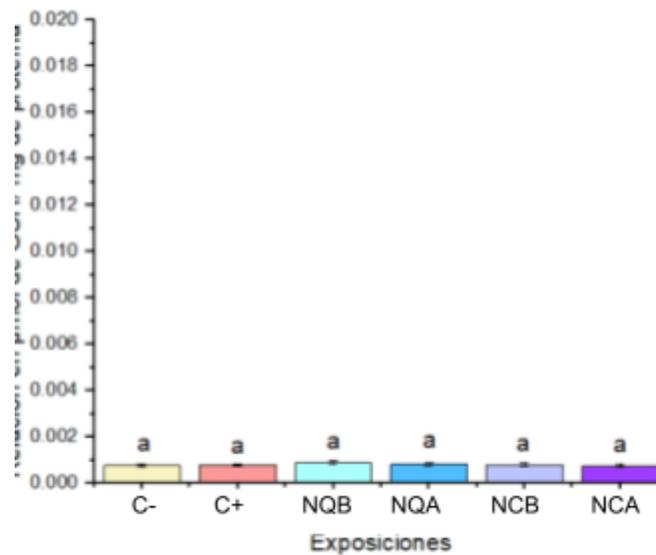
Gráfico 6. Cuantificación de glutatión extracelular liposomas



Nota: Resultado de la cuantificación de GSH extracelular en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), LVB (Liposomas vacíos de baja concentración), LCB (Liposomas con GSH de baja concentración), LVA (Liposomas vacíos de alta concentración) y LCA (Liposomas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

Por lo que se sugiere que los nanosistemas sí se encuentran en el tejido.

Gráfica 7. Cuantificación de glutatión extracelular nanopartículas



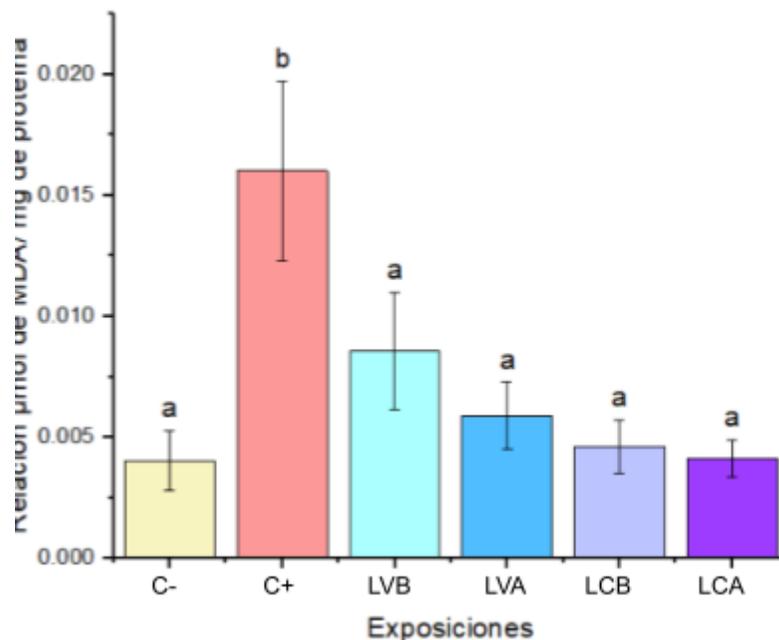
Nota: Resultado de la cuantificación de GSH extracelular en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), NQB (Nanopartículas vacías de baja concentración), NCB (Nanopartículas con GSH de baja

concentración), NQA (Nanopartículas vacías de alta concentración) y NCA (Nanopartículas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

TBARS

La siguiente prueba TBARS, cuantifica MDA producto de lipoperoxidación mediada por radicales libres y estrés oxidante (Pérez Gastell et al., 2000). En el gráfico 8 se puede observar que el resultado del control positivo que fue expuesto al estresor peróxido de hidrógeno incrementó los niveles de MDA comparado con el control negativo que son las células no tratadas lo cual debido al mecanismo de peróxido de hidrógeno sugiere la lipoperoxidación de membrana lo cual se ve reflejado con un incremento de los niveles de MDA.

Gráfico 8. Cuantificación de MDA por método de TBARS en liposomas

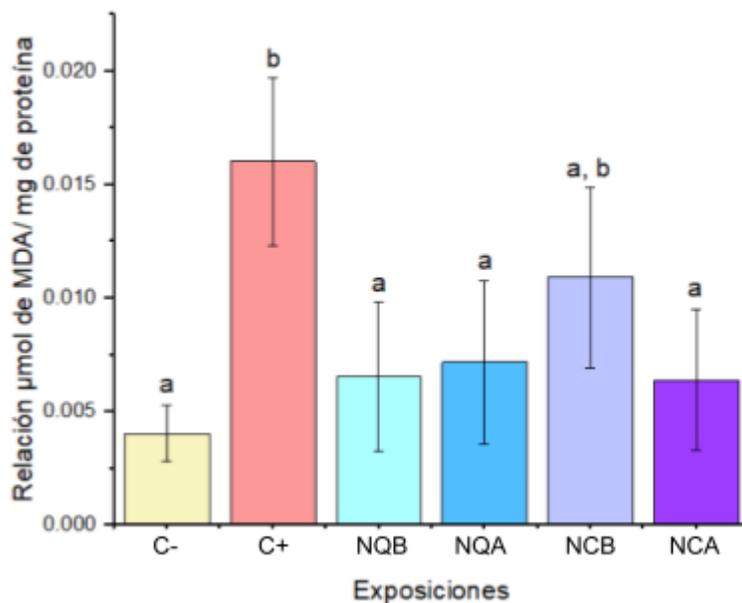


Nota: Resultado de la cuantificación de MDA por métodos de TBARS en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), LVB (Liposomas vacíos de baja concentración), LCB (Liposomas con GSH de baja concentración), LVA (Liposomas vacíos de alta concentración) y LCA (Liposomas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

En el gráfico 8 se observan los resultados de MDA para liposomas en la que encontramos que los nanosistemas presentan resultados similares al control negativo tanto para liposomas vacíos y cargados.

La misma respuesta ocurre con las nanopartículas de quitosano cargadas y vacías, excepto para la exposición de nanopartículas con GSH de baja concentración representada en el gráfico 9. Por lo tanto, esto podría apuntar a que la entrada de las nanoestructuras, por lo menos la mayoría de las exposiciones no ocasionó daños significativos en la membrana celular, que en contraste con la primer prueba posterior a las exposiciones %EROs, corrobora que la exposición a los nanosistemas no genera estrés en el tejido (Frigaard et al., 2022).

Gráfica 9. Cuantificación de MDA por método de TBARS en nanopartículas



Nota: Resultado de la cuantificación de MDA por métodos de TBARS en el tejido en donde se encuentran los tratamientos: C- (células no tratadas), C+ (células con peróxido de hidrógeno), NQB (Nanopartículas vacías de baja concentración), NCB (Nanopartículas con GSH de baja concentración), NQA (Nanopartículas vacías de alta concentración) y NCA (Nanopartículas con GSH de alta concentración). Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre la media (Fisher $p < 0.05$).

IX. Conclusión

De acuerdo con los resultados anteriores se demostró que ambos sistemas nanoestructurados presentan respuestas similares en cuanto a su capacidad antioxidante con respecto a los biomarcadores de estado redox medido.

La concentración seleccionada del agente estresor la cual fue 100 μm , peróxido de hidrógeno es la óptima para el cultivo organotípico realizado ya que se encontraron alteraciones en el estado redox celular sin tener efectos irreversibles.

Las características fisicoquímicas de los nanosistemas no afectaron al tejido posterior a su exposición según las pruebas de %EROs y TBARS, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los sistemas cargados y vacíos, lo cual sugiere que algún componente de la formulación podría estar interaccionando.

El GSH medido durante la experimentación puede ser producto de la defensa antioxidante celular así como del de los nanosistemas, por lo tanto, es necesario realizar más pruebas que den certeza del origen del GSH cuantificado como podría ser los tiempos de liberación.

X. Perspectivas

Debido a sus diferencias fisicoquímicas se requieren realizar otras pruebas para explicar el comportamiento de las nanopartículas y los liposomas, principalmente para GSH intracelular. Estas podrían ser dirigidas hacia el tiempo de liberación de ambos nanosistemas en el tejido expuesto, así como pruebas enzimáticas, como la glutatión reductasa (GPx) que son dependientes de GSH.

También podría realizarse una combinación con el agente estresor para observar la actividad entre ambos nanosistemas y evidenciar si tienen una actividad antioxidante, además se ha planificado trabajar con un modelo de rata generando un daño a nivel articular y determinar si la administración de nanopartículas y liposomas disminuye el estrés oxidante inducido.

Por último, se ha planteado el generar una forma farmacéutica a partir de la modificación del pH del medio de los nanosistemas debido a que el pH de las nanopartículas es ácido y el de los liposomas neutro, así como llevar a cabo mediciones de otros biomarcadores como son la expresión y síntesis de SOX9 y colágeno II que se encuentran presentes en el cartílago y se alteran cuando se está bajo un estímulo estresor en el caso de la osteoartritis.

XI. Referencias

- *Angthong C., Phumala, N., & Sutipornpalangkul, W. (2013). Can levels of antioxidants in synovial fluid predict the severity of primary knee osteoarthritis: a preliminary study. SpringerPlus. <http://www.springerplus.com/content/2/1/652>*
- *Arias, A. (2017). Osteoarthritis. Revista Cubana de Medicina Física y Rehabilitación, 6(2). <https://revrehabilitacion.sld.cu/index.php/reh/article/view/171/172>*
- *Batalla, J., Cuadros, A., & San Martín-Martínez, E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Lat. Am. J. Phys. Educ, 8(4), 4319-2. <http://www.lajpe.org>*
- *Blanco, F. J., J del Toro, F., & Galdo, F. (2000). El óxido nítrico y el cartilago articular. Revista Española de Reumatología. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-el-oxido-nitrico-el-cartilago-9275>*
- *Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. Schweizerische Medizinische Wochenschrift. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>*
- *Cajigas JC, Ariza R, Espinosa R, Méndez C, y col. Guía de práctica clínica basada en la evidencia para el diagnóstico y tratamiento de la osteoarthritis. Med Int Mex 2011;27(6):552-572.*
- *Cárdenas, N., & Pedraza, J. (2015). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. Educación Química, 8, 164-173. <https://repositorio.pediatrica.gob.mx/art-invest2006-07.pdf>*
- *Carvajal, C. R. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Medicina Legal de Costa Rica, 36(1), 91-100. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1002562>*
- *Chapter 1 Pathogenesis of Osteoarthritis. (2015). En Osteoarthritis, Pathogenesis, Diagnosis, Available Treatments, Drug Safety, Regenerative and Precision Medicine (pp. 1-28). Mohit Kapoor. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19560-5>*

- Chevalier, X. (2009). *Fisiopatología de la artrosis*. EMC - Aparato Locomotor, 42(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s1286-935x\(09\)70905-0](https://doi.org/10.1016/s1286-935x(09)70905-0)
- CIATEJ. (2017). *Liposomas*. TECNOLOGÍAS DE NANO/MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b83493481.pdf
- Corrales, L. C., Muñoz, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213-225. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200009&lng=en&tlng=es.
- Da Silva, A. (2022). *Cultivos organotípicos*. STUDOCU. <https://www.studocu.com/es/document/universidad-francisco-de-vitoria/metodologia-iii/apuntes-meto-iii/48822162>
- Denzoin, L. A., Soraci, A. L., y Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3), 529-539. ISSN: 0325-2957. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53529349007>
- Espinosa, D. A., Morín, V. B., Tena, O. B., Herrera, E. A. G., Maldonado, K. D. L., Díaz, A., Olivares, M. S., & Mares, D. M. (2019). El papel de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 62(3), 6-19. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.3.03>
- Ecuvegetal. (2019). *Antioxidantes*. <https://ecuvegetal.com.ec/antioxidantes/>
- Farmacias San Pablo. (2020). ¿Qué son los liposomas? *Blog Dermocosméticos*. <https://www.farmaciasanpablo.com.mx/dermo/cuidado-de-la-piel/que-son-liposomas>
- Forman, H. J., & Rinna, A. (2009). *Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griending, K. K. (2018). *Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling*.

Circulation Research, 122(6), 877-902.
<https://doi.org/10.1161/circresaha.117.311401>

- Forriol, C. (2002). *El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular*. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*.
<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-cirugia-ortopedica-traumatologia-129-articulo-el-cartilago-articular-aspectos-mecanicos-13038046>
- Frigaard, J., Jensen, J. L., Galtung, H. K., & Hiorth, M. (2022). *The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles*. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.880377>
- Garcia, JM. (2002). *Introducción al cultivo de tejidos*.
<http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>
- Garzón, L. (2008). *Nanopartículas lipídicas sólidas*. *Redalyc*.
<https://www.redalyc.org/pdf/579/57939107.pdf>
- Gavira, F. J. (2020). *Preparación de liposomas biocompatibles. Ventajas de su utilización en los tratamientos contra el cáncer. Depósito de investigación de la Universidad de Sevilla*. <https://hdl.handle.net/11441/104035>
- Giacopini, M. I. (2016). *La peroxidación lipídica y enfermedades crónicas degenerativas*. *Tribuna del Investigador*.
<https://www.tribunadelinvestigador.com/ediciones/2016/1/art-18/>
- Goycoolea, F. M., Remuñán, C., & Alonso, M. J. (2009). *Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano [Portal de Investigación]. En Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas (pp. 103-131)*.
<http://bibliotecavirtual.ranf.com/es/consulta/registro.do?id=19087>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019). *Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683-19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.006217>
- Hayden, P., & Harbell, J. W. (2021). *Special review series on 3D organotypic culture models: Introduction and historical perspective*. *In Vitro Cellular &*

Developmental Biology – Animal, 57(2), 95-103.
<https://doi.org/10.1007/s11626-020-00500-2>

- He, Y., Li, Z., Alexander, P., Ocasio, B. D., Yocum, L., Lin, H., & Tuan, R. S. (2020). Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models. *Biology*, 9(8), 194.
<https://doi.org/10.3390/biology9080194>
- Hicks JJ, Torres YD, Sierra MP. (2006) Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr*.14(4):223-226.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2006/er064b.pdf>
- Hurlbeck, C. (2014). Evaluation of biomarkers for osteoarthritis caused by fragmented medial coronoid processes in dogs. *ELSEVIER*.
www.elsevier.com/locate/rvsc
- Jiang, Y., & Tuan, R. S. (2014). Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(4), 206-212. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.200>
- López, M. J., Carames, B., Cillero, B., & Blanco, F. J. (2004). Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-pdf-13064151>
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Mandri, F. S. (2017). ¿Qué es el glutatión y para qué sirve? *Blog De Salud Natural De Farmacia De Serra*.
<https://www.farmaciaserra.com/blog/post/que-es-glutation-para-que-sirve.html>
- Márquez, E., Hernández, D., Míguez, M. P., Soler, F., & Pérez, M. (2021). LAS NANOPARTÍCULAS y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS. En *LAS NANOPARTÍCULAS Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS*. Universidad de Extremadura.
<https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/11784/1/978-84-09-25218-3.pdf>

- Membrillo, A., Córdova, A., Hicks, J. J., Olivares, I. M., Martínez, V. M., & Valencia, J. J., (2003). *Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión*. *Interciencia*, 28(12), 699-704. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200006&lng=es&tlng=es
- Megías M., Molist P., Pombal M. A. *Atlas de histología vegetal y animal*. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.
- Mikušová, V.; Mikuš, P. *Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 9652. <https://doi.org/10.3390/ijms22179652>
- Montalvo, E. E., García, M. A., Escalante, T., Peña, J., Vázquez, H., & Ortega, J. A. (2011). *Caracterización bioquímica y niveles de lipoperoxidación en el preacondicionamiento hepático*. *Cirugía y Cirujanos*, 79(2),132-140. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=66221099006>
- Pérez, P. L., & Pérez, J. L. (2000). *Métodos para medir el daño oxidativo*. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572000000300007&lng=es&tlng=es
- Pradhan, K. K., & Chakraverty, S. (2021). *Introduction to Nanostructures*. En *Nano Scaled Structural Problems: Static and Dynamic Behaviors* (pp. 1-10). https://doi.org/10.1063/9780735422865_001
- Revilla, E. M., (2021). *ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, IMPORTANCIA E IMPLICACIÓN PATOLÓGICA*. *Revista Científica Ciencia Médica*, 24(2), 125-132. <https://doi.org/10.51581/rccm.v24i2.400>
- Rizeq, B., Younes, N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). *Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5776. <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>
- Rodríguez, A. G., Guzmán, J. C. A., & Vazquez, R. (2018). *Membrana celular y la inespecificidad de las nanopartículas. ¿Hasta dónde puede*

llegar un nanomaterial dentro de la célula? *Mundo nano*.
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.62711>

- Sánchez, J. C., & López, D. F. (2011). *Fisiopatología celular de la osteoartritis: el condrocito articular como protagonista*. *Iatreia*, 24(2), 167-178. ISSN: 0121-0793.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180522556008>
- Segura, M., & Cardona, N. (2017). *Capítulo 3. Cartilago y membrana sinovial principios y técnicas de reparación*. SECOT.
https://unitia.secot.es/web/manual_residente/CAPITULO%203.pdf
- Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M. S., & Perrie, Y. (2020). *Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154-155, 102-122.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>
- Srinivasaiah, S., Musumeci, G., Mohan, T., Castrogiovanni, P., Absenger-Novak, M., Zefferer, U., Mostofi, S., Rad, E. B., Grün, N. G., Weinberg, A., & Schäfer, U. (2019). *A 300 µm Organotypic Bone Slice Culture Model for Temporal Investigation of Endochondral Osteogenesis*. *Tissue Engineering Part C-methods*, 25(4), 197-212.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0368>
- Thermo Fisher Scientific. (2023). *Invitrogen H2DCFDA*. Fisher scientific part.
<https://www.fishersci.es/shop/products/molecular-probes-h2dcfda-h2-dcf-dcf/11560326>
- Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentevilla, I., & Haidar, Z. S. (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)*. *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463-1471.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022018000401463>

- Vaca-González, J. J., Gutiérrez, M. E., & Garzón-Alvarado, D. A. (2017). *Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 31(4), 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.rccot.2017.06.002>
- Valenzuela De León, E. (3 C.E.). *Revisión de literatura en métodos de fabricación y caracterización de micro/nanopartículas para encapsulación de compuestos bioactivos usando quitosano como material encapsulante [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.*
- Vega, J. A., García-Suárez, O., Fernández, D., & Del Valle, M. E. (2002). *Bioquímica y biología del cartílago articular. ELSEVIER.* <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-cirugia-ortopedica-traumatologia-129-pdf-13038047>

XII. Anexos

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Colegio de Técnicos Académicos



Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: Ximena Hernández Moncada, Laura Denise López Barrera, Patricia Ramírez-Noguera y Roberto Díaz Torres

Por su participación en la presentación del cartel

Estudio de la capacidad antioxidante de dos nanosistemas en cultivos organotípicos de cartílago de rata

Realizada a distancia el 18 de octubre de 2023 en el **6º Congreso Nacional de Tecnología.**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, octubre de 2023.


Dr. David Quintanar Guerrero
Director de la Facultad


Dr. Gustavo Mercado Mancera
Presidente del Colegio de Técnicos Académicos

6º CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA
CONATEC 2023

"Divulgación de la tecnología como soporte de la academia"



Folio: 202300619