



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE
ÁCIDO-POLILÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA) CON CURCUMINA Y SU
ACTIVIDAD SOBRE LAS ENZIMAS GLUTATIÓN PEROXIDASA Y
REDUCTASA.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

DELGADILLO LARA CARLOS ALFREDO

ASESORA: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

CO-ASESOR: DR. ROBERTO DÍAZ TORRES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

A mi Mamá Elena Lara por todo tu esfuerzo y a quien debo todo lo que soy, gracias por siempre motivarme y apoyarme en alcanzar mis metas y poder llegar a este sueño que hoy es una realidad, pero sobre todo por brindarme tu infinito amor y encaminarme a ser un hombre de bien, SIEMPRE ESTARÉ AGRADECIDO.

A Rafael Rodríguez por su confianza, cariño y apoyo e inspirarme a siempre superarme y querer buscar más éxitos, has sido muy importante en mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me abrió sus puertas desde la ENP N° 9 y no sólo formarnos como profesionales, sino como personas también.

A la FES Cuautitlán por todos los profesores y personas que contribuyeron a mi formación.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera y el Dr. Roberto Díaz Torres por darme la oportunidad y confianza de participar en este proyecto. Y de quienes no sólo recibí conocimientos, sino también su amistad muchas gracias, son un gran ejemplo a seguir como personas, tuve mucha suerte en conocerlos.

Se hace un especial agradecimiento al proyecto PAPIIT IN219715 por el apoyo para la adquisición de los insumos requeridos para realizar este trabajo de Tesis.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico principalmente a Elena Lara y Rafael Rodríguez que día a día me brindaron el apoyo necesario para poder llegar a esta meta tan importante.

A mi Hermana Paulina por ser esa personita que me ha ayudado a ver la vida desde otro punto de vista y que me he servido muchísimo a superar dificultades. Espero te sirva de inspiración y motivación para lograr lo que te propongas, esta tesis también es tuya.

A mi Papá José Luis por apoyarme y mi hermano Pepe por mostrarme el gusto por la química.

A toda mi familia en general por brindarme palabras de aliento y sus ánimos gracias a cada uno.

A mis Amigos del laboratorio 9 quienes aparte de darme su compañerismo me brindaron su amistad gracias Ángel, Raúl, Penélope, Sofía, Denis, Eric, Alexis.

A cada una de las personas que pasaron por mi vida y contribuyeron mucho o poco a este logro tan importante de mi vida gracias a todos.

Y Carlos has sólo lo que amas y serás feliz, y el que hace lo que ama, está benditamente condenado al éxito, que llegará cuando deba llegar, porque lo que debe ser, será y llegará naturalmente.



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Estudio de la localización de nanopartículas a base de ácido-poliláctico-co-Glicólico-(PLGA) con curcumina y su actividad sobre las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa.

Que presenta el pasante: Carlos Alfredo Delgadillo Lara
Con número de cuenta: 307112310 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Noviembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	

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

IHM/cga*

1. Contenido

1. Contenido	5
1.1 Índice de Figuras	8
1.2 Índice de Gráficos	9
1.3 Índice de Tablas.....	9
1.4 ABREVIATURAS	9
2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1 Nanotecnología.....	11
2.2 Tipos de Nanopartículas	12
2.3 Polímeros.....	14
2.4 Métodos Para fabricación de Nanopartículas.	14
2.4.1 Método de difusión de emulsificación.....	15
2.4.2 Salting-out	15
2.5 Nanoesferas y Nanocápsulas	16
2.6 Nanopartículas de Ácido-poliláctico-Co-Glicólico – (PLGA).....	17
2.7 Nanotoxicología.	18
2.8 Biomarcador.....	20
2.8.1 Biomarcadores de Efecto	20
2.8.2 Biomarcadores de Exposición.	21
2.8.3 Biomarcadores de Susceptibilidad.....	21
2.8.4 Biomarcadores de Respuesta.	22
2.9 Nanopartículas como Nanoacarreadores.....	22
2.10 Curcumina.....	24
2.10.1 Usos de la Curcumina.	26
2.10.2 Curcumina: Actividad Biológica	28

2.11 Enzimas	30
2.11.1 Enzimas Antioxidantes	30
2.12 Radicales libres.....	30
2.12.1 Aparición de las especies reactivas de oxígeno (ROS)	31
2.13 Glutati3n (GSH).....	32
2.13.1 Glutati3n Reductasa.	33
2.13.2 Glutathion Peroxidasa	34
2.14 Microscopía confocal.	36
2.15 Partes.....	38
2.15.1 La fuente de luz:	38
2.15.2 Sistema 3ptico:	38
2.15.3 Filtros de interferencia:	38
2.15.4 Detectores:	38
2.15.5 Computadora:.....	39
3. Planteamiento del problema.....	39
4 Objetivos.	42
4.1 Objetivo General:	42
4.2 Objetivos particulares:.....	42
5. Metodología.....	43
5.1 Materiales	43
5.1.1 Preparaci3n de Nanopartículas a Base de PLGA.....	43
5.1.2 Cultivos Celulares.....	43
5.2 Soluciones	44
5.2.1 Medio de Cultivo	44
5.2.2 Soluciones para preparaci3n de Nanopartículas	44

5.2.3	Proteínas totales.....	44
5.2.4	Glutación Reductasa	44
5.2.5	Ensayo de glutación peroxidasa.....	44
6.	Equipos	45
7.	Modelos Experimentales	45
8.	Métodos.....	45
8.1	Preparación de Nanopartículas.....	46
8.2	Cuantificación de la cantidad de curcumina y polímero de los sistemas..	47
8.2.1	Barrido de la Curcumina	47
8.3	Cuantificación de los sistemas de PLGA con Curcumina	47
8.4	Exposición a células.....	48
8.5	Determinación para la actividad de glutación Reductasa	48
8.6	Controles:.....	51
8.7	Determinación para la actividad de Glutación Peroxidasa.....	51
8.7.1	Para la muestra	51
8.7.2	Medición de la Actividad	52
8.8	Mantenimiento de los cultivos celulares.....	53
8.9	Determinación de Proteínas totales por el método de Bradford.....	54
8.10	Microcultivos para microscopía confocal.....	55
8.11	Preparación de laminillas para microscopia confocal.....	56
8.12	Metodología en diagrama general.	57
9.	Resultados y Análisis de resultados.....	59
9.1	Exposición a células HepG-2 a diferentes concentraciones de curcumina	59
9.1.1	Resultados Glutación Peroxidasa.	59

9.1.2 Resultados Glutación Reductasa	62
10 Imágenes.....	66
10.1 Controles negativos	66
10.2 Dosis Baja.....	67
10.3 Dosis Alta.....	70
11. Conclusión.....	73
Referencias.....	74

1.1 Índice de Figuras

Figura 1 Escala Comparativa del tamaño de las nanopartículas	12
Figura 2 Clasificación de los materiales nanoestructurados	14
Figura 3 Representación de una nanoesfera y nanocápsula	17
Figura 4 Estructura del ácido poliláctico-co-glicólico	19
Figura 5 Internalización de las nanopartículas	24
Figura 6 Cúrcuma y curcumina	25
Figura 7 Estructura química de la Curcumina	26
Figura 8 Diferentes usos de la curcumina	28
Figura 9 Metabolismo de glutatión en célula de mamífero	36
Figura 10 Esquema de microscopio confocal	38
Figura 11 Preparación del microcultivo celular	56
Figura 12 Esquema del montaje de microcultivo celular	57
Figura 13 Controles Negativos	66

Figura 14 Dosis Baja	67
Figura 15 Dosis Alta	70

1.2 Índice de Gráficos

Gráficos 1 Glutación Peroxidasa	60
Gráfico 2 Glutación Reductasa	63

1.3 Índice de Tablas

Tabla 1 Principales vías de Transporte Celular	23
Tabla 2 Ejemplo de los radicales libres más frecuentes	32
Tabla 3 Cantidad de reactivos a utilizar para medir la Actividad de GPx	50
Tabla 4 Cantidad de reactivos a utilizar para medir la Actividad de GRd.....	53
Tabla 5 Cantidad de reactivos a utilizar para medir proteínas totales	55
Tabla 6 Resultados de la actividad de Glutación Peroxidasa	59
Tabla 7 Resultados de la actividad de Glutación Reductasa	62

1.4 ABREVIATURAS

- NP Nanopartículas
- PLGA Ácido-poliláctico-co-Glicólico

- L-PLA L-ácido poliláctico
- PLA Ácido Poliláctico
- PGA Ácido poliglicólico
- SLN's Nanopartículas sólidas lipídicas
- GSH Glutati3n reducido
- GSSG Glutati3n oxidado
- GRd Glutati3n Reductasa
- GPx Glutati3n Peroxidasa
- GSSG Glutati3n oxidado
- nm nan3metros
- μL microlitros
- DMSO Dimetil sulf3xido
- SFB Suero Fetal Bovino
- PBS Buffer Fosfato Salino
- BSA Alb3mina S3rica Bovina
- DAPI 4 ',6-diamino-2-fenilindol
- Cbp Cantidad basta para
- Å Angstroms ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$)
- NADPH Nicotinam3n aden3n dinucle3tido fosfato reducido
- FAD Flav3n aden3n dinucle3tido

2. MARCO TE3RICO

2.1 Nanotecnología

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala. Cuando se manipula la materia a la escala tan minúscula de átomos y moléculas, demuestra fenómenos y propiedades totalmente nuevas. Por lo tanto, científicos utilizan la nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas novedosos de poco costo con propiedades únicas. La revolución nanotecnológica, se asocia, por una parte, a la "fabricación molecular" cuya viabilidad tendría un impacto enorme en nuestras vidas, en la economía y en la sociedad en general en un futuro no muy lejano. Entre los efectos, destacan su potencial impacto en la medicina, la biología, el medioambiente, la informática, la construcción, etcétera. Los progresos "más cuestionados" en materia de nanorobots y autoreproducción son objeto de polémica entre los expertos. Lo que no cabe duda es que la revolución ha comenzado. Y también el debate sobre sus beneficios y riesgos. (Barreto, 2011)

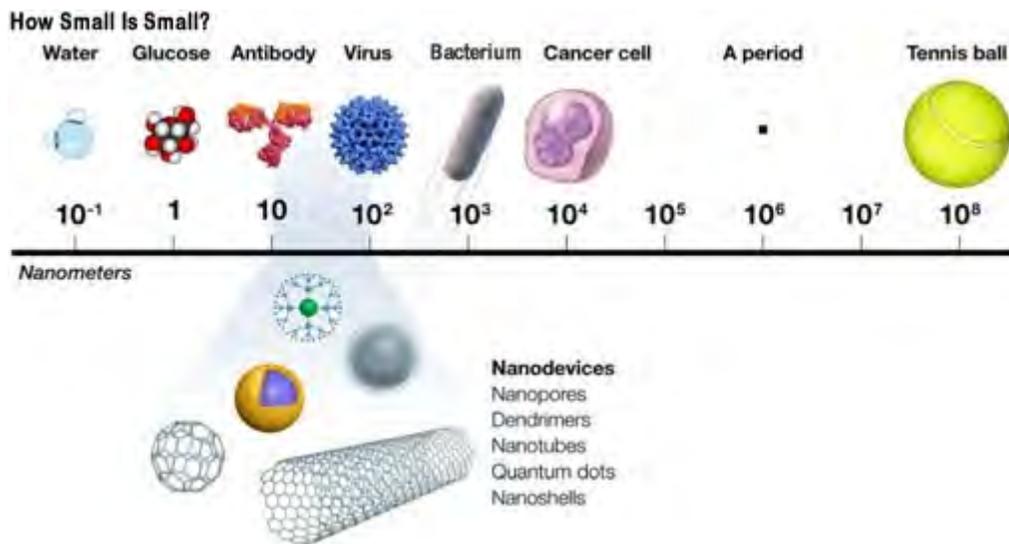


Figura 1 Escala Comparativa del tamaño de las nanopartículas
(<https://www.nanosonic.com/29/nanocomposites>)

La nanotecnología es un campo inherentemente interdisciplinario y emergente en el cual se conjuntan la física, la biología, la química, la ingeniería y las ciencias sociales. Su objetivo es entender, caracterizar, manipular y explotar las características físicas de la materia a la nanoescala, para generar innovaciones tecnológicas teniendo en consideración su impacto social y ambiental. Se trata de una tecnología clave que constituye una de las áreas que aportará mayor desarrollo al siglo XXI al originar aplicaciones basadas en los fenómenos que suceden a escalas atómicas (1 nanómetro es 1 millonésimo de milímetro). Se habla de que esta tecnología será el detonante de una nueva revolución industrial ya que las posibilidades de creación de nuevos materiales y dispositivos a partir de átomos y moléculas parecen ilimitadas. Según un documento de la National Science Foundation de los Estados Unidos, la nanotecnología detonará un nuevo desarrollo tecnológico a nivel mundial equiparable a la revolución industrial del siglo XVIII. (CNyN-UNAM, 2010).

2.2 Tipos de Nanopartículas

Las Nanopartículas (NP), son partículas más grandes que los que los átomos y moléculas, no obedecen a la química cuántica, ni a las leyes de la física clásica, poseyendo características propias. No existe una definición única de NP aunque la mayoría de autores piensan que son porciones de materia diferenciadas del medio donde se encuentran y cuya longitud, al menos en una de sus dimensiones está entre 1 y 100 nanómetros. Se producen de forma natural en caso de incendios forestales, erupciones volcánicas, etcétera, pero debido al desarrollo industrial y a su uso en muchos procesos industriales se ha tomado conciencia de la exposición tanto del hombre como el medio ambiente.

Una de las características de las NP es que la relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula es de carácter exponencial. Por ello poseen propiedades relacionadas con la superficie, como las eléctricas, mecánicas, magnéticas, ópticas o químicas son diferentes a las de los mismos materiales a escala no nanométrica. (Ma T. Frejo, 2011)

Estas propiedades juegan un papel importante en la toxicidad de estas partículas y es trascendental conocerlas para entender, predecir y gestionar el riesgo potencial que presentan, mediante nuevos ensayos adaptados a sus propiedades.

Las nanopartículas se clasifican generalmente en función de su dimensión, morfología, composición, uniformidad, y aglomeración. (Figura 1) Una distinción adicional importante debe hacerse entre películas delgadas nanoestructuradas u otros objetos a escala nanométrica fija (como los circuitos dentro de microprocesadores de ordenadores) y conexión nanopartículas. (Buzea Cristina, 2007).

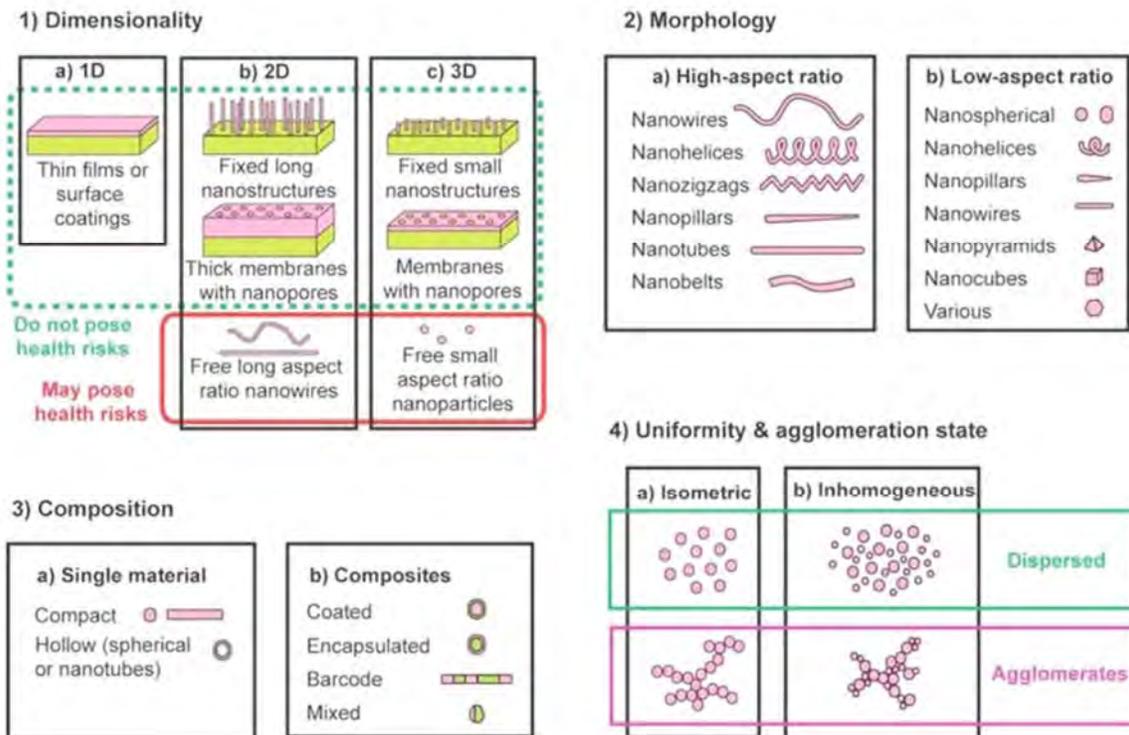


Figura 2. Clasificación de los materiales nanoestructurados desde el punto de vista de las dimensiones nanoestructura, la morfología, la composición, la uniformidad y el estado de aglomeración. (Buzea Cristina, 2007)

2.3 Polímeros.

Los sistemas de transporte a base de materiales poliméricos en forma de nanopartículas requieren polímeros biocompatibles y biodegradables. Sin embargo, el riesgo potencial de infecciones e inmunogenicidad inducidas por sustancias poliméricas de origen animal o vegetal llevó a la necesidad de utilizar materiales sintéticos para reemplazar los polímeros naturales. Consecuentemente, una gran variedad de polímeros sintéticos ha sido desarrollada en los últimos quince años, teniendo en cuenta el requisito básico para materiales de aplicación biomédica: estos polímeros deben ser completamente degradados y eliminados del organismo. Los poliésteres son un grupo particularmente atractivo para el desarrollo de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además, algunos miembros de este grupo de polímeros presentan baja inmunogenicidad y pueden ser combinados con una amplia variedad de fármacos y otras moléculas de interés terapéutico. (ROCHA FORMIGA, 2009)

2.4 Métodos Para fabricación de Nanopartículas.

Existen varios métodos diferentes para la preparación de nanopartículas, como así también numerosas formas de incorporar los fármacos en las partículas. A modo de ejemplo, los fármacos pueden ser encapsulados en la matriz polimérica, (en el núcleo de las nanopartículas), conjugados químicamente con el polímero, o adsorbidos en la superficie de la partícula. (Ronald J. Neufeld, 2006)

El método más comúnmente utilizado para la preparación de las NPS, es la emulsificación-evaporación. Esta técnica ha dado buenos resultados para encapsular fármacos hidrofóbicos, pero ha tenido pobres resultados en la incorporación de agentes bioactivos de carácter hidrofílico.

La emulsificación-evaporación consiste en la disolución del polímero y el compuesto en un solvente orgánico (diclorometano o cloruro de metileno). La emulsión se prepara mediante la adición de agua y un surfactante a la solución de polímeros. En muchos casos, la formación de “nano-gotas” por parte del polímero es inducida por sonicación (ultrasonido) u homogeneización.

El disolvente orgánico luego es evaporado y las nanopartículas son generalmente recolectadas por centrifugación y liofilización. (Hans M. L., 2002)

2.4.1 Método de difusión de emulsificación.

Se utiliza un solvente parcialmente soluble en agua como acetona o carbonato de propileno. Los polímeros y compuestos bioactivos se disuelven en el disolvente y luego se emulsionan en la fase acuosa que contiene el estabilizador. Este último evita la agregación de las gotas de la emulsión por adsorción en la superficie de las mismas. El agua se agrega a la emulsión, para permitir la difusión del solvente en el agua. La solución se agita y se produce la precipitación de las partículas. Posteriormente se recogen por centrifugación, o el disolvente puede eliminarse por diálisis.

Las nanopartículas también pueden ser obtenidas por el método de nanoprecipitación. Con esta técnica, los fármacos y el polímero se disuelven en acetona y se añaden a una solución que contiene tensoactivos. Luego la acetona es evaporada a presión reducida y las nanopartículas permanecen en la suspensión acuosa resultando en partículas de 110 a 208 nm. (Patrick, 1995)

2.4.2 Salting-out

Otro método utilizado es el de salting-out. Mediante esta técnica, se forma una emulsión agua/aceite que contiene polímeros, agua, acetona, acetato de magnesio, estabilizador (tensoactivo) y el componente activo. Posteriormente se añade agua hasta que el volumen es suficiente para permitir la difusión de la acetona en el medio acuoso, lo que resulta en la formación de nanopartículas. Esta suspensión se purifica por filtración de flujo transversal y liofilización. Sin

embargo, una desventaja de este procedimiento es que usa sales que son incompatibles con muchos compuestos bioactivos. (Llabot Juan, 2008)

2.5 Nanoesferas y Nanocápsulas

Los pequeños capilares en el cuerpo tienen entre 5-6 μm de diámetro. El tamaño de las partículas que se distribuyen en la circulación sanguínea debe ser significativamente menor a 5 μm , sin la formación de agregados, para garantizar que las partículas no produzcan una embolia. Por este motivo, las NPS tienen ventajas sobre micropartículas. El término nanopartícula es el nombre colectivo que reciben tanto nanoesferas como nanocápsulas. Las Nanoesferas son de tipo matricial y en este caso los fármacos pueden ser absorbidos en la superficie de la esfera o encapsulada dentro de la partícula. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que la droga es vehiculizada en la cavidad interna; el sistema consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica. (Hans M. L., 2002).

En este caso, las sustancias activas suelen ser disueltas en el núcleo interno, pero también pueden ser adsorbidas a la superficie de la capsula.

Una gran variedad de fármacos pueden ser vehiculizados utilizando diversas estrategias (hidrofílicos, hidrofobos, proteínas, macromoléculas biológicas, etc.). Se pueden formular para la absorción selectiva por el sistema linfático, el cerebro, las paredes arteriales, los pulmones, el hígado, el bazo, o circulación sistémica.

Las características más importantes de las NPS son su tamaño, la eficiencia de encapsulación, potencial zeta (carga superficial), y la liberación del fármaco. (Llabot Juan, 2008)

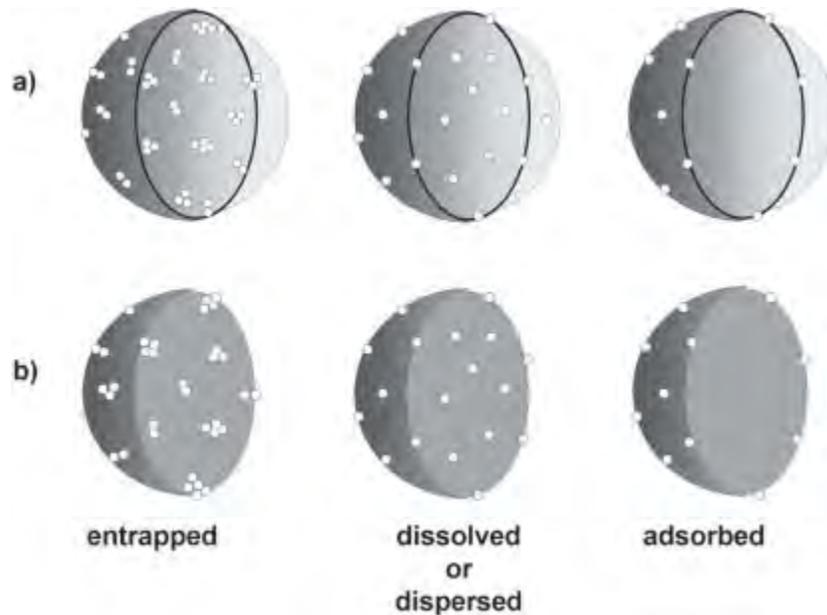


Imagen 3 - Representación de una (a) Nanoesfera y (b) Nanocápsula
(Alves MP, 2007)

En esta revisión, se pretende resumir las técnicas utilizadas para la preparación de nanopartículas poliméricas, incluidos los tipos de polímeros y estabilizadores utilizados, y la forma en que estos afectan a la estructura y las propiedades de las NPS. Además, discutiremos los avances en las modificaciones superficiales, los fármacos y la administración sitio específica.

2.6 Nanopartículas de Ácido-poliláctico-Co-Glicólico - (PLGA)

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión, de unidades monoméricas de ácido láctico o bien de dímeros lácticos-co-glicólicos. Estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables. El isómero L-ácido poliláctico (L-PLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables.

En las últimas dos décadas el (PLGA) ha sido uno de los más atractivos candidatos utilizados para fabricar dispositivos poliméricos para la administración de fármacos y en cuantiosas aplicaciones de ingeniería. El PLGA es biocompatible, biodegradable, exhibe una amplia gama de tiempos de degradación, tiene propiedades mecánicas detectables y lo más importante, se aprobó por la FDA (Food and Drug Administration).

El Poliéster PLGA es un copolímero del ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). Es el mejor biomaterial definido disponible para la administración de fármacos en cuanto a diseño y rendimiento. El PLA contiene un carbono- α asimétrico que se describe típicamente como la forma D o L en términos estereoquímicos clásico y a veces como R y la forma S, respectivamente. Las formas enantioméricas del polímero PLA son el ácido poli-D-láctico (PDLA) y ácido L-poliláctico (PLLA). PLGA es generalmente un acrónimo de poli D, L-láctico-co-glicólico de ácido en forma D- y L- ácido láctico están en igual proporción (Figura 4). (Hirenkumar K. Makadia, 2011).

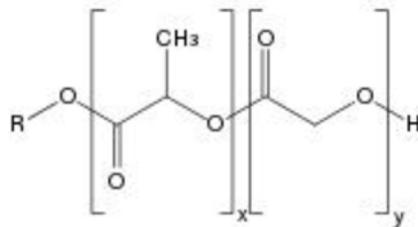


Figura 4 Estructura de ácido láctico-co-glicólico poli ("X" es el número de unidades de ácido láctico y "Y" es el número de unidades de ácido glicólico). (Hirenkumar K. Makadia, 2011)

2.7 Nanotoxicología.

La nanotoxicología es el estudio de la toxicidad de los nanomateriales, nanopartículas y nanocompuestos. Debido a los efectos cuánticos del pequeño tamaño y la gran superficie en relación al volumen, los nanomateriales tienen propiedades únicas en comparación con sus propiedades cuando son más grandes. (K Donaldson, 2004).

Para que verdaderamente la nanotecnología nos brinde un mejor nivel de vida es indispensable entender que no sólo tiene grandes beneficios, sino que, también trae consigo una cantidad inmensa de preguntas que deben ser atendidas.

Básicamente los motivos de preocupación son dos: la peligrosidad de las nanopartículas por sí mismas y el riesgo de contaminación. El primero se refiere a los efectos biológicos y químicos de la exposición a las nanopartículas que puede tener el ser humano o animales en el caso de medicamentos veterinarios, mientras que el segundo tiene que ver con la liberación de éstas al medio ambiente, así como con su circulación y concentración, que pueden representar un peligro para los organismos o los ecosistemas. (Reyes Horacio, 2009)

De las mayores preocupaciones acerca de la toxicología de las nanopartículas proviene del hecho que muchas de ellas poseen propiedades redox o son fotoactivas. Por ejemplo, las nanopartículas de dióxido de titanio presentes en una gran cantidad de bloqueadores solares son fotocatalíticas, por lo que la exposición al sol genera radicales libres que podrían degradar a los componentes del producto o ser dañinas para la piel, sin embargo, aunque los estudios no muestran que en realidad exista algún riesgo tampoco los descarta completamente.

Algunas nanopartículas pueden atravesar fácilmente la membrana celular y unirse de manera muy selectiva a las mitocondrias, pudiendo desde el punto de vista médico servir como liberadores muy eficientes de medicamentos. (Horacio Reyes, 2008)

El conocimiento de la toxicología tradicional sobre la evaluación de exposición, el transporte a través del cuerpo y el destino final de tóxicos convencionales, no es siempre aplicable a las Nanopartículas y es motivo de controversia y del establecimiento de procedimientos y especificaciones en particular asociadas a la Toxicología convencional. Esto debido a que su tamaño les provee de propiedades únicas, por eso es indispensable el uso de métodos alternativos que tomen en cuenta estas propiedades. En última instancia, lo anterior nos podría llevar al desarrollo de nuevos modelos estructura-actividad para partículas con

esta escala de tamaño, lo cual implica el nacimiento de una nueva disciplina: la Nanotoxicología. (UNESCO, 2007).

Científicos dedicados a la nanotecnología han sido capaces de identificar el riesgo potencial que representan las nanopartículas y han tomado acciones contundentes para evitar daños o paliarlos de manera adecuada. Sin embargo, este camino apenas comienza, pero al menos se ha trazado la ruta adecuada. Es importante que en países como México en donde apenas comenzamos a transitar la ruta “nano” tomemos en cuenta este tipo de iniciativas, para no ser sorprendidos y al final tener que remediar grandes problemas que hubieran podido ser prevenidos antes de gestarse, como nos ha sucedido en el pasado.

De tal manera que en una visión un tanto “pesimista”, las nanopartículas podrían contaminar más o ser más peligrosas que los compuestos actuales.

Para poder hacer una estimación de lo que se está buscando primero se tiene que tener uno o varios biomarcadores o marcadores biológicos para poder determinar los cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a este trabajo pero primero se revisara que es un biomarcador y para qué sirve. (Colvin., 2003)

2.8 Biomarcador

Biomarcador es aquella sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. (Stransky B, 2007)

2.8.1 Biomarcadores de Efecto

Son sustancias endógenas o cambios biológicos o bioquímicos que revelan modificaciones reversibles de las constantes fisiológicas; son los biomarcadores más estudiados, e incluyen modificaciones en la composición celular de la sangre, alteraciones en algunas actividades enzimáticas; aparición de aductos del DNA o incrementos localizados del m-RNA; aumento de determinadas proteínas,

aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o contra fracciones celulares (membrana núcleo etc.) o en las estructuras histológicas. (Manuel Repetto, 2009)

2.8.2 Biomarcadores de Exposición.

Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste xenobiótico. El análisis se utiliza en fluidos corporales (sangre y orina) o incluso aire expirado. En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra del agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Por ejemplo la concentración de bifenilos policlorados (PCBs) en sangre refleja la cifra acumulada en los principales órganos de depósito (tejido graso). Bernard y Lauwerys dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (ej. Plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (ej. Tioeteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilicas y, por lo tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas. (Gil, 2008)

2.8.3 Biomarcadores de Susceptibilidad.

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o un grupo de compuestos tóxico. Se debe generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de DNA y sus fragmentos de restricción, clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas. Entre ello podemos distinguir dos tipos: marcadores de polimorfismo de sistemas activadores y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los marcadores de polimorfismo de sistemas activadores permiten estimar la actividad de las enzimas del citocromo P-450. Las hemoproteínas conocidas como citocromos P450 (CYP) están implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. El sistema isoenzimático microsomal del citocromo P450 humano

está constituido por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias, que a su vez, se agrupan en subfamilias constituidas por genes polimórficos. (Gil, 2008)

2.8.4 Biomarcadores de Respuesta.

El biomarcador de respuesta o es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificadores en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del DNA, incrementos localizados de RNAm, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (auto anticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.) (Gil, 2008)

2.9 Nanopartículas como Nanoacarreadores

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) ha aprobado ya algunos tratamientos para algunas enfermedades basados en nanopartículas. A partir de entonces, se han explorado diversos polímeros para formulación de nanopartículas como por ejemplo el polibutilcianoacrílate, el cual luego de diversos estudios se demostró su toxicidad. Actualmente los más empleados son copolímeros y polímeros biodegradables como el PLGA y el polifeprosan. Los mecanismos por los cuales se transportan las nanopartículas a las células, son variados y se encuentran reportados en la literatura. (Jörg, 2001)

Tabla 1. Principales vías de transporte celular (Jörg, 2001).

Pequeñas Moléculas	Transporte pasivo	Difusión simple
		Difusión facilitada
		Osmosis
		Diálisis
	Transporte activo	Bomba de sodio-potasio
Grandes Moléculas	Endocitosis	Fagocitosis

		Pinocitosis
		Endocitosis mediada por receptores
	Exocitosis	

El más aceptado es mediante la endocitosis; (figura 5) aunque existen otros factores aparte del tamaño, que favorecen o desfavorecen el acceso de las nanopartículas a las células.

Dentro de estos Nanoacarreadores encontramos las llamadas Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN's), que son partículas coloidales constituidas por una matriz lipídica sólida a temperatura fisiológica, compuesta de lípidos fisiológicos y (ácidos lípidos, triglicéridos y ceras), estabilizados por surfactantes biocompatibles, en las que se ha logrado encapsular eficientemente agentes quimioterapéuticos como doxorubicina y paclitaxel. Nanopartículas de polibutilcianoacrilato (PBCA). El PBCA es un polímero biodegradable que se ha empleado ampliamente en la preparación de nanopartículas. Al circular en la sangre, las nanopartículas son con facilidad absorbidas por órganos ricos en macrófagos como el hígado y bazo, por lo cual puedan ser efectivas para aplicaciones en el cerebro, es necesario modificarlas químicamente.

Como ya se me menciona anteriormente el PLGA, es un polímero que con frecuencia es usado en alimentos y fármacos. Los diferentes tipos de PLGA, dependiendo de su composición ácido láctico: ácido glicólico, y parámetros de síntesis influyen fuertemente en las propiedades finales de este. Debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad es candidato potencial como acarreador de fármacos en diversas líneas celulares y según estudios de fácil acceso a células del cerebro. (Alvarez-Lemus, 2012).

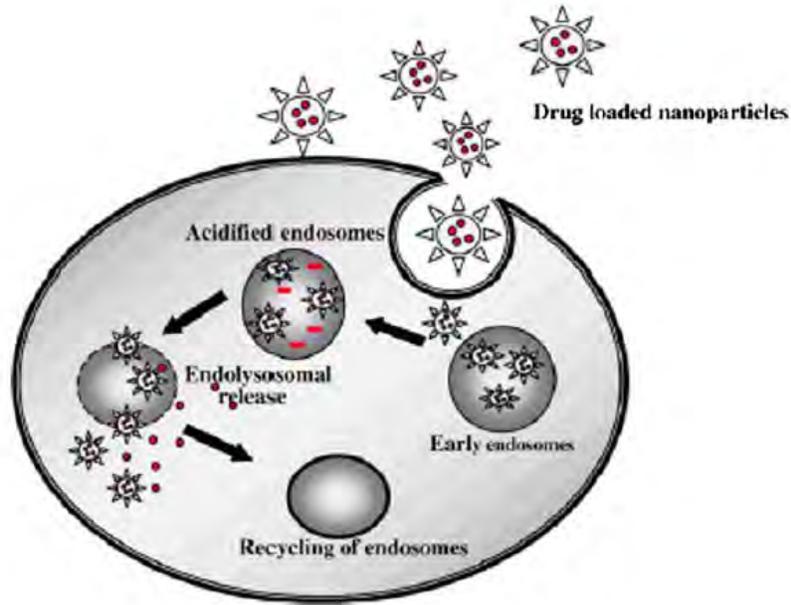


Figura 5. Representación esquemática de la internalización de Nanopartículas (Alvarez-Lemus, 2012)

Como lo muestran las evidencias, el uso del PLGA es una excelente opción para la obtención de nanopartículas con propiedades acarreadoras, de biodegradabilidad, biocompatibilidad por lo que se considera ideal para la incorporación de fármacos y en este trabajo en particular se trata de la Curcumina, un extracto que se encuentra principalmente en la raíz de la planta *Curcuma longa*, y que además no es única de esta especie, y su importancia principal radica en sus propiedades antioxidantes las cuales se describen a continuación.

2.10 Curcumina.



Figura 6 Cúrcuma en polvo (color amarillo) curcumina (color naranja) y raíz de la cúrcuma (RED ESPRESS, 2015).

La curcumina es un antioxidante fenólico de color amarillo natural y se extrajo primero en una forma impura. La estructura de la curcumina fue aclarada y fue sintetizada por Milobedeska y Lampe, respectivamente. Muchas empresas aíslan la curcumina de diferentes especies de plantas y la comercializan como producto, pero se aísla principalmente de la raíz de *Curcuma longa*.

Por otra parte, la curcumina posee la mayor actividad bioprotectora, neuroprotectora y antidiabética de los tres curcuminoides mostrados en la figura 7, Curiosamente, la mezcla de curcuminoides ha aumentado la actividad nematocida en comparación con los compuestos individuales, lo que sugiere un efecto sinérgico (Ornchuma Naksuriya, 2013) La estructura química de la curcumina se muestra a continuación.

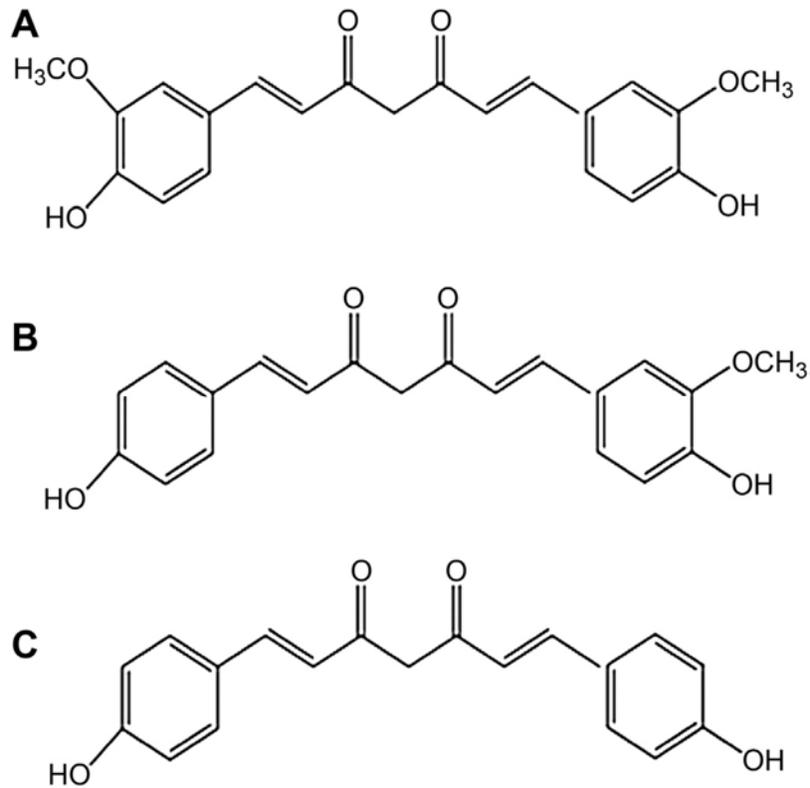


Figura 7. Las estructuras químicas de (A) Curcumina, (B) Demetoxicurcumina y (C) Bisdemetoxicurcumina (Ornchuma Naksuriya, 2013)

2.10.1 Usos de la Curcumina.

Durante muchos siglos, la curcumina en su forma cruda se ha utilizado como especias y suplemento dietético, así como componente de muchas medicinas tradicionales asiáticas. En estudios recientes, se ha demostrado que la curcumina exhibe una amplia gama de actividades farmacológicas contra muchas enfermedades crónicas, como la diabetes tipo II, reumatismo, la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y aterosclerosis, también inhibe la agregación plaquetaria, suprime trombosis e inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). (Jayaraj Ravindran, 2009)

Además, la curcumina mejora la cicatrización de heridas y protege contra la lesión hepática, formación de cataratas, toxicidad pulmonar y la fibrosis. (Najeh Maissar Khalil T. C., 2012)

Finalmente, la actividad anti-cáncer de la curcumina ha sido ampliamente investigado y se ha sugerido como una agente potencial para la prevención y el tratamiento de una gran variedad de diferentes tipos de cáncer, incluyendo gastrointestinal, melanoma, genito-urinario, de mama, de pulmón, de cabeza y cuello, neurológico y el sarcoma. (Ashish M. Kam, 2007)

A un nivel molecular, la curcumina no sólo inhibe la proliferación celular y la metástasis, sino que también induce apoptosis modulando varios factores pro-inflamatorios (por ejemplo, la interleucina 1 (IL-1), IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón γ (INF - γ), entre otros figura 8 (Jayaraj Ravindran, 2009).

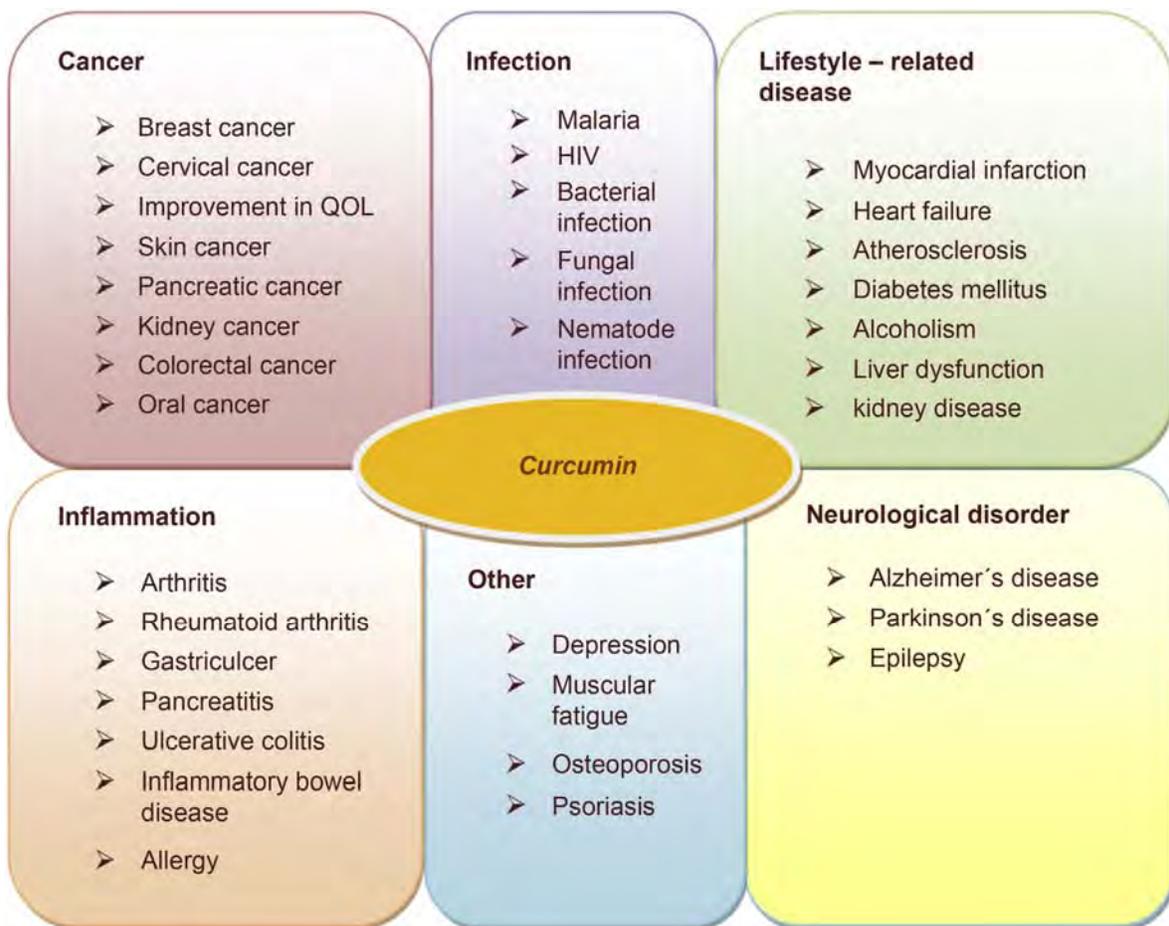


Figura 8. Diferentes Usos de la Curcumina (Ornchuma Naksuriya, 2013)

Se ha sugerido que, debido a las propiedades pleiotrópicas asociadas a la curcumina, este compuesto puede modular respuestas específicas de manera más eficiente que los medicamentos que actualmente se emplean para el tratamiento del cáncer. (Ornchuma Naksuriya, 2013).

Muchos estudios preclínicos han demostrado que la curcumina tiene actividad anticancerígena y anti-inflamatoria eficaz. En un reciente estudio clínico se publicó que después de la administración oral de curcumina ésta fue bien tolerada en dosis de 12 g / día que indica que la curcumina es segura. (Ashish M. Kam, 2007)

Cabe resaltar que esta característica es causada por su muy baja biodisponibilidad, lo que tiene como consecuencia concentraciones sanguíneas subóptimas para lograr efectos terapéuticos. Por ejemplo, en un estudio en ratas reportados en un artículo (Yang K, 2007) una concentración máxima en suero de $0.36 \pm 0.05 \mu\text{g} / \text{ml}$ después de una inyección intravenosa de 10 mg/kg se alcanzó, mientras que 500 mg/ kg administrado por vía oral curcumina dio una concentración plasmática máxima de $0.06 - 0.01 \mu\text{g/ml}$, lo que indica que la biodisponibilidad oral fue de sólo el 1%. Razón por la cual esta tesis tiene un enfoque para mejorar las pobres propiedades biofarmacéuticas de la curcumina y más que mejorar su solubilidad acuosa, una muy buena opción es el uso de Nanopartículas debido a los amplios beneficios que esta nueva tecnología nos ofrece. (Zhu minpeng, The Stability of Curcumin and Drug-Loading Property of Starch Microspheres for It, 2012)

2.10.2 Curcumina: Actividad Biológica

Como se ha mencionado la curcumina tiene propiedades fisicoquímicas que no son las ideales para la actividad biológica. La curcumina puede pasar libremente a través de las membranas celulares debido a su lipofilia, sin embargo, debe ser

mencionado que la curcumina tiene una solubilidad en agua muy baja de sólo 0.6 mg / ml y es susceptible a la degradación en particular bajo condiciones alcalinas. Estas características se han asociado con una muy baja biodisponibilidad lo que resulta en una concentración sanguínea subóptima para lograr efectos terapéuticos. (Jinghua Duana, 2010)

Como ya se menciona la pobre solubilidad en agua y baja biodisponibilidad oral de la curcumina son los grandes inconvenientes en su aplicación medicinal, las nanopartículas estudiadas representan un primer paso importante en el desarrollo de un medicamento que contiene curcumina, utilizando la nanotecnología como una herramienta. Es por esto que se busca tener un aumento de la biodisponibilidad de la curcumina por medio de sistemas de nanopartículas ya que se han confirmado excelentes capacidades de la nanopartículas para modular las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, lo que resulta en perfiles farmacocinéticos mejorados. (Najeh Maissar Khalil T. C., 2013)

Durante las últimas décadas, diversos tipos de nanopartículas, liposomas, conjugados, portadores de péptidos etc., se han usado para la administración de fármacos siendo investigados y algunos sistemas han llegado a evaluación clínica y aplicaciones, demostrado que son adecuados para aumentar la biodisponibilidad de la curcumina y su administración dirigida a tumores y enfermedades anteriormente mencionadas. (Duncan, 2011).

Como se ha venido señalando el uso de la curcumina es una muy buena opción para tratar el estrés oxidativo de las células y el uso de Nanopartículas de PLGA como Nanoacarreadores se espera sea una forma ideal para poder incorporar este fármaco, debido a sus propiedades anteriormente descritas.

Para poder saber el efecto antioxidante que tiene la curcumina contenida en las Nanopartículas de PLGA es necesario el uso de biomarcadores respuesta que para este trabajo de tesis son Glutati6n Peroxidasa (Gpx) y Glutati6n Reductasa (GRd); dos enzimas características del estrés oxidativo celular (Jorge Lim6n-Pacheco, 2009).

2.11 Enzimas

Kuhne en el año de 1876 les llamó “enzima” a los catalizadores que producían fermentaciones de diversos compuestos, La palabra enzima significa “en la levadura”, pues fue en estos organismos donde se observó por primera vez la fermentación del azúcar en alcohol. (Arce, 2015).

2.11.1 Enzimas Antioxidantes

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular. Esto ocurre en patologías degenerativas, de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, etc.

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo grave se llega a graves alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento de DNA, aumento de la concentración de calcio intracelular, descomposición de iones de Fe^{+2} y Cu^{+2} catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones y otras proteínas específicas, y peroxidación de lípidos. El daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes. (Dorado Martínez, 2003)

2.12 Radicales libres

Los radicales libres son entidades químicas que contienen un electrón no apareado, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a

otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos

2.12.1 Aparición de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Durante el proceso evolutivo, con la aparición de los organismos fotosintéticos, se dio un aumento en los niveles de oxígeno, permitiendo a los organismos desarrollar los mecanismos necesarios para utilizar esta molécula como aceptor final de electrones, lo que permitió a las células tener sistemas de producción de energía altamente eficientes a través de la oxidación de la glucosa. A través de esta ruta metabólica se producen hasta 38 moléculas de ATP por la oxidación de una molécula de glucosa. Esta ventaja evolutiva de los organismos aerobios, trajo como efecto colateral, el aumento en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, ya que la reducción parcial de oxígeno lleva a la formación de ROS. El aumento en los niveles de las especies reactivas llevó a la evolución de sistemas de defensa antioxidantes intra y extracelulares tanto enzimáticos como no enzimáticos para mantener el equilibrio redox.

Tabla 2 Ejemplo de los radicales libres más frecuentemente producidos por los sistemas biológicos que dan origen a especies reactivas A: Radical libre y B: reacciones más comunes que los origina.

A: Radical libre	B: Reacción más común que los origina
$\cdot\text{O}_2^-$ Radical superóxido	$\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADPH}^+ + \text{H}^+ + 2 \cdot\text{O}_2^-$
$\cdot\text{OH}$ Radical hidroxilo	$\cdot\text{UQ} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{UQ} + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$
$\text{RO}_2\cdot$ Radical peroxilo	$\text{LH} + \text{RO}_2\cdot \rightarrow \text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$
$\text{RO}\cdot$ Radical alcoxilo o fenoxilo	$\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}\cdot$
$\text{L}\cdot$ Radical peróxido lípido	$\text{L O}_2\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$
$\cdot\text{NO}_2$ Radical de óxido nítrico	$\cdot\text{OH} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{NO}_2$

2.13 Glutación (GSH)

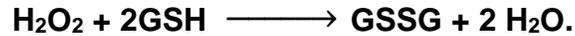
El glutación (GSH) es un tripéptido no proteínico que se deriva de los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. Contiene un enlace péptido inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato.

Es nucleofílico en azufre y ataca los aceptores conjugados electrofílicos venenosos. En efecto, el glutación reduce cualquier enlace disulfuro formado dentro de proteínas citoplasmáticas de cisteínas, al actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutación se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutación (GSSG).

GSH, es un antioxidante intracelular principal (normalmente presente en las células en una concentración de 1 a 10 mM) que proporciona protección contra hidroperóxidos así como radicales libres. GSH también está implicado en la inactivación de muchos tóxicos y carcinogénicos electrófilos de ambos orígenes endógenos y xenobióticos a través de reacciones catalizadas por las numerosas transferasas de glutación como un sustrato para la glutaredoxina. (John Wiley, 1999).

GSH sirve como reductor en la biosíntesis catalizada por la ribonucleótido reductasa del DNA precursores desoxirribonucleótidos. Muchas otras funciones celulares dependen también del glutación.

El glutación se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que vuelve de su forma oxidada, la glutación reductasa, es constitutivamente activa e inducible al estrés oxidativo. De hecho, la proporción de glutación reducido a glutación oxidado dentro de las células a menudo se utiliza científicamente como una medida de la toxicidad celular. (John Wiley e hijos, Inc., 1999)



2.13.1 Glutati3n Reductasa.

Uno de estos sistemas antioxidantes es el sistema glutati3n peroxidasa/glutati3n reductasa. La glutati3n reductasa (GRd, EC 1.6.4.2.) es una flavoenzima dependiente del nicotinam3n aden3n dinucle3tido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducci3n del glutati3n oxidado (GSSG) a glutati3n reducido (GSH) el cual ser3a utilizado por la glutati3n peroxidasa (GPx) para la reducci3n del per3xido de hidr3geno (H_2O_2) y de lipoper3xidos (L-OOH), los cuales son elementos t3xicos. Es decir, espec3ficamente tiene una funci3n de pivoteo en el estr3s oxidativo. Esta se encuentra en todos los organismos aer3bicos as3 como en algunas plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima casi universal. (Prego, 2006).

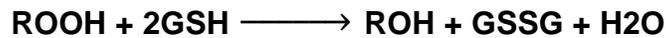
El sistema antioxidante GPx/GRd est3 relacionado con otros sistemas antioxidantes como el super3xido dismutasas/catalasa (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no act3an a la par, la CAT act3a en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y a bajas concentraciones act3a la GPx. La actividad de la CAT y de la GPx est3 inversamente correlacionada, mientras que la CAT y la GRd presentan correlaci3n positiva.

La GRd permite mantener concentraciones de GSH en la c3lula no s3lo para ser utilizado por la GPx en la eliminaci3n del H_2O_2 ; sino tambi3n de utilidad en la recuperaci3n de las vitaminas C (3cido asc3rbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminaci3n de radicales libres generados "*in situ*" o a distancia.

Por tanto, la alteraci3n de la actividad de la GRd provocar3 disminuci3n en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de especies reactivas del ox3geno. La alteraci3n de la actividad de la GRd y de los niveles de GSH por esta consecuencia se ha reportado en varios procesos patol3gicos y est3 asociada con un aumento del riesgo al estr3s oxidativo. (Prego, 2006)

2.13.2 Glutathion Peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) es el nombre dado a la enzima que catalizan la siguiente reacción:



Donde “R” puede ser hidrógeno, un grupo acilo graso libre, colesterol, un esteroide, un éster de uno de estos grupos o bases libres de DNA o RNA. GSH es el tripéptido tiol γ -glutamil cisteinil glicina, conocido como (reducido) y glutatión GSSG es la forma oxidada de glutatión.

Los productos proteicos de dos familias relacionadas de genes tienen actividad de glutatión peroxidasa seleno- (Se) GPXS y las transferasas de glutatión (GSTs). La expresión de los genes para estas proteínas es bastante variable entre los animales especies, tejidos y líneas celulares derivadas. En la literatura, la actividad de la glutatión peroxidasa puede referirse tanto a la actividad de una sola proteína (GPX1 en los tejidos sólidos o en GPX3 plasma) o a diferentes colecciones de actividades (GPX1, GPX2, GST y GPX4) dependiendo de la especie de animal, los tejidos o líneas celulares derivadas de muestras, el ensayo de condiciones y la inclinación de los autores. El uso de diferentes condiciones de ensayo puede ser bastante exclusivo o inclusivo en cuanto al tipo de actividades detectado. Condiciones de ensayo selectivo utilizado con muestras no fraccionadas, o, en combinación con el uso de columnas de tamaño o de otros métodos de separación de un solo paso, se pueden utilizar para informar eficazmente sobre los componentes individuales en muchas de las combinaciones de proteínas glutatión peroxidasa que se producen en tejidos. Las principales cuestiones estratégicas son las siguientes. (John Wiley e hijos, Inc., 1999).

2.14 Microscopía confocal.

La Microscopía Confocal es una tecnología que permite observaciones a una resolución mayor que la que se puede lograr con la microscopía óptica convencional.

Emplea un sistema láser que aplica el haz de luz en forma de barrido, en una pequeña parte del espécimen. El laser aplicado a una longitud de onda determinada en la muestra, hace que moléculas excitadas de la misma, emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La fluorescencia en una muestra puede ser debida a moléculas que se encuentran de forma natural (autofluorescencia como en el caso de la clorofila y en este caso en particular la curcumina) o puede ser producida por moléculas aplicadas artificialmente a la muestra llamadas fluorocromos. Hay una gran cantidad de fluorocromos específicos en el mercado usados para diferentes estructuras celulares y para diferente emisión de fluorescencia. El uso de varias combinaciones de laser capaces de detectar y producir fluorescencia a diferentes longitudes de onda, permite un escaneo de la muestra en un amplio rango del espectro de luz, permitiendo la observación de estructuras teñidas con tal detalle como no se puede lograr con técnicas convencionales. Debido a que penetra fácilmente la muestra, el microscopio confocal logra imágenes en diferentes planos focales que ligados a un programa de computo, puede reproducir una imagen tridimensional del material observado.

Las siguientes características han hecho de la microscopia con focal una de las herramientas de trabajo predilectas por científicos de las ciencias biológicas médicas y de materiales de todo el mundo:

- ✓ Alta sensibilidad en la observación.
- ✓ Especificidad en la emisión de la fluorescencia.
- ✓ Mayor Resolución.
- ✓ Tridimensionalidad de las imágenes. (Gutiérrez, 2015)

Como se muestra en la Figura 10 El rayo laser (luz azul) es filtrado por un agujero y un espejo dicroico; luego es enfocado mediante un lente objetivo sobre el espécimen y estimula la fluorescencia presente en el mismo (luz verde).

La fluorescencia es recolectada por el objetivo y dirigida al espejo dicroico que la refleja y dirige hacia un detector. Un segundo filtro con agujero se coloca frente al detector y sólo deja pasar la luz proveniente del plano de enfoque (línea continua). La fluorescencia fuera de foco de las zonas que están por encima y por debajo del plano de enfoque (en líneas discontinuas) no pasa por el agujero y por lo tanto no formará parte de la imagen.

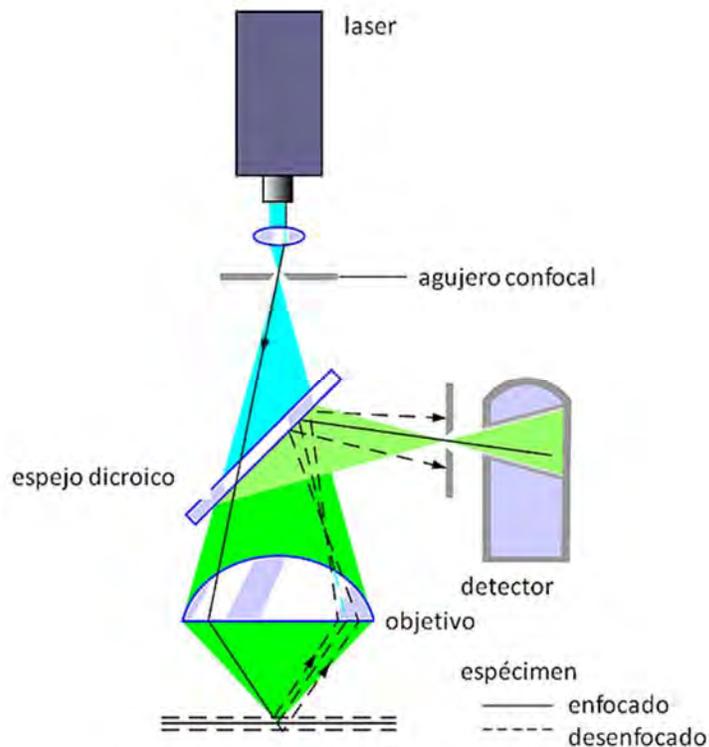


Figura 10: Esquema que muestra de manera simplificada el principio del microscopio confocal y el trayecto de la luz. (Modificado de Olschewski F., 2000. Software in confocal microscopy.)

2.15 Partes

Los microscopios confocal modernos son instrumentos altamente sofisticados y sus elementos principales son:

2.15.1 La fuente de luz:

Generalmente emplea una fuente de luz muy poderosa (laser o lámpara de arco). Se pueden utilizar sistemas de rayos laser multi-frecuencia (en el rango ultravioleta, luz visible e infra-roja) adaptados a los tipos de marcadores fluorescentes empleados para el contraste de los elementos celulares. Se han desarrollado dos técnicas, la de escaneo con un solo rayo (laser) y el escaneo con múltiples rayos. La primera es la más popular y emplea un par de espejos controlados por computadora para escanear el espécimen. La técnica multi-rayos utiliza una lámpara de arco y el escaneo se realiza gracias a un disco rotatorio (disco de Nipkow) conformado por micro-lentes y micro-agujeros. Esta última técnica de iluminación disminuye el daño a los especímenes e incrementa la detección.

2.15.2 Sistema óptico:

El sistema óptico de los microscopios está basado en los principios fundamentales que se mantienen inalterados, sin embargo están complementados con los avances en óptica moderna y la tecnología electrónica.

2.15.3 Filtros de interferencia:

Incluyen espejos dicromáticos o dicroicos, barreras con agujero de diámetro variable y diversos filtros de excitación (para seleccionar la longitud de onda de excitación del fluorocromo).

2.15.4 Detectores:

Son fotodetectores muy sensibles a la fluorescencia emitida. Para los microscopios con múltiples rayos generalmente se usan cámaras CCD (charge-coupled device).

2.15.5 Computadora:

Configurada con los requisitos suficientes de memoria y procesador, tarjetas de video de alta resolución, complementadas con software de captura, análisis y procesamiento de imágenes, así como también de impresoras de muy alta calidad. (Torres, 2015).

3. Planteamiento del problema.

La ciencia tiene que abordar las necesidades que la sociedad le plantee. Los retos de la ciencia en las próximas décadas se darán en las siguientes áreas: energía, medio ambiente, alimentación, salud y tecnología. Además, estos progresos deberán hacerse con un enfoque social, intentando disminuir las diferencias que existen entre seres humanos y países.

Para resolver estas necesidades, todas las ciencias y las tecnologías serán necesarias y se plantearán aproximaciones multidisciplinarias, en las que la química seguirá suministrando moléculas para preparar materiales y aportará métodos y conceptos para racionalizar resultados. Por ello, la química seguirá siendo la ciencia central en el siglo XXI.

Para contribuir a abordar estos retos, la investigación química se está moviendo entre dos áreas multidisciplinarias, la biomedicina y la ciencia de los materiales, que serán las principales protagonistas de los avances científicos que beneficiarán a la sociedad.

En el futuro tenderemos a tener instrumentación lo más diminuta posible. Un límite factible de alcanzar es el tamaño molecular, es decir, a escala de decenas de angstroms ($1 \text{ \AA} = 10^{-10}\text{m}$), donde ensamblajes de un número pequeño de

moléculas serán capaces de transformar energía eléctrica, lumínica o térmica en energía mecánica, en las denominadas máquinas moleculares.

Mientras este objetivo se alcanza, se están haciendo progresos en materiales en escala nanométrica, lo que ha dado lugar a una rama científica, la nanociencia, y su aplicación práctica, la nanotecnología. Actualmente se están estableciendo las bases científicas de esta área, pero las aplicaciones ya empiezan a ser una realidad.

Hoy en día existen más de 1.000 productos comerciales que contienen nanopartículas, desde cremas solares hasta material deportivo. Ya se ha publicado en los medios de comunicación que esta área de negocios experimenta un crecimiento espectacular, empezando a ser rentable. Por lo tanto, los investigadores deben intensificar sus esfuerzos para comprender mejor los efectos potenciales de éstos materiales sobre los sistemas biológicos. Sin embargo, con respecto a la nanomedicina, los efectos adversos de las partículas no han sido ampliamente estudiados, posiblemente porque la utilización de materiales biodegradables y biocompatibles, fueron ya aprobados por la FDA.

Se ha venido estudiando que el área de superficie específica de nanopartículas es responsable de los posibles efectos adversos debido a que el pequeño tamaño de partícula aumenta el área de superficie específica, exponiendo así más átomos o moléculas (y por tanto más reactiva) este aspecto podría ser la base de la producción de especies reactivas del oxígeno, en el que donantes o aceptores de electrones situados en el nanomaterial interactúan con oxígeno molecular, lo que resulta en la formación de anión superóxido o peróxido de hidrógeno, que posteriormente se oxida a otras especies químicas por parte de un mecanismo de transferencia de electrones. La producción de especies reactivas del oxígeno ha sido reportada como el más probable mecanismo por el cual estas partículas ejercen un efecto tóxico. Por lo tanto, es muy importante el estudio de la actividad oxido-reductora.

Los estudios “*in vitro*” utilizando líneas celulares son actualmente los mas socorridos y pueden dar indicios muy importantes sobre la toxicidad de sistemas microscópicos dando pie posteriormente a que se realice un modelo experimental en un sistema “*in vivo*” en esté trabajo de tesis se utilizó como modelo experimental “*in vitro*” células Hepáticas de Humano (HepG-2).

Con las incertidumbres mencionadas anteriormente sobre los potenciales efectos de superficie, tamaño y composición de nanopartículas poliméricas, Este trabajo se centró en esclarecer el efecto de nanopartículas a base de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) con objeto de generar resultados valiosos para continuar con la investigación sobre los riesgos y beneficios de estas nanopartículas en específico como acarreadores de fármacos, que este trabajo se trata de Curcumina, que ha mostrado ejercer diversos efectos biológicos asociados al estrés oxidativo intracelular. (Preetha Anand, 2009)

La curcumina como se he mencionado con anterioridad, es un polifenol natural presente en la cúrcuma (*Curcuma longa*) con baja toxicidad intrínseca pero una amplia gama de actividades farmacológicas, que incluyen antitumoral, antioxidante, anti-amiloide y las propiedades anti-inflamatorias. (Ashish M. Kam, 2007) Sin embargo, a pesar de sus actividades farmacológicas prometedoras, la extremadamente baja solubilidad en agua de la curcumina limita su biodisponibilidad y eficacia clínica. (Ornchuma Naksuriya, 2013).

Las nanopartículas de PLGA pueden mejorar la estabilidad de la Curcumina, su biodisponibilidad y la eficacia clínica, ya que puede ser utilizada en una amplia gama de áreas de la medicina, y un elevado número de propiedades benéficas para el organismo que día con día sigue creciendo. (Zhu minpeng, The Stability of Curcumin and Drug-Loading Property of Starch Microspheres , 2012)

Como hemos mencionado la curcumina es un potente antioxidante, pero para poder verificar esta actividad son necesarios biomarcadores, y en particular se decidió estimar la actividad enzimática de dos enzimas importantes en la modulación del estado óxido-reductor intracelular. Así mismo, con el objetivo de

estimar la disponibilidad celular a las Nanopartículas de interés, se estudiará la localización intracelular de NP de PLGA-Curcumina en las células HepG-2 expuestas, mediante microscopía confocal.

4 Objetivos.

4.1 Objetivo General:

Conocer la localización de nanopartículas preparadas a base de PLGA (Ácido Polilactoco-co-glicolico) con curcumina en células hepáticas humanas mediante el análisis por microscopía confocal y estimar su efecto en la actividad de las enzimas, glutatión peroxidasa y reductasa.

4.2 Objetivos particulares:

- Realizar el análisis de microscopía confocal para conocer la localización de Nanopartículas preparadas a base de PLGA cargadas con curcumina en la línea celular hepática HepG-2 (ATCC)
- Conocer los efectos sobre la actividad de las enzimas glutatión reductasa (GSH Red) y glutatión peroxidasa asociados a la exposición de las de nanopartículas preparadas a base de PLGA con curcumina.

5. Metodología

5.1 Materiales

5.1.1 Preparación de Nanopartículas a Base de PLGA

- ❖ Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)
- ❖ Polivinil alcohol (PVA)
- ❖ Acetona
- ❖ Agua destilada

5.1.2 Cultivos Celulares

- ❖ Buffer de fosfatos
- ❖ Solución 100X Penicilina Estreptomina Corning

Suero fetal bovino (SFB) ATCC[®]

- ❖ Tripsina –EDTA ATCC[®]
- ❖ Medio de cultivo DMEM 1X Corning[®] (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)
- ❖ Para la Preparación de PBS:
 - Fosfato de potasio monobásico 99.2%
 - Fosfato di básico de sodio 99-100.5%
 - Cloruro de sodio 99.5%
 - Cloruro de potasio 100%

5.2 Soluciones

5.2.1 Medio de Cultivo

- Medio de cultivo DMEM 1X Corning con 4.5 g/L glucosa, L-glutamina & piruvato de sodio. Suplementado con SFB al 10% y 2% de Solución 100X Penicilina Estreptomicina Corning®

5.2.2 Soluciones para preparación de Nanopartículas

- PVA en agua destilada
- PLGA en acetona
- NaOH 0.01N pH 7.2-7.4
- HCl 0.01N

5.2.3 Proteínas totales

- Albumina sérica bovina 1mg/ml (BSA)
- Reactivo de Bradford 1:3
- PBS

5.2.4 Glutación Reductasa

- Buffer de ensayo (30°C)
- Agua bidestilada
- GSSG 20mM
- NADPH 2mM

5.2.5 Ensayo de glutación peroxidasa

- Buffer de ensayo
- GSH 10 mM
- NADPH 2 mM
- Azida de sodio 1.125M
- Enzima Glutación Reductasa 100 U/ml

6. Equipos

- Agitador magnético MRC® modelo GMH-5E
- Balanza analítica Sartorius BL 120S
- pHmetro OAKTON pH 510 series pH/mV°C meter
- Microcentrífuga con control de la temperatura Microfuge® 22R Centrifuga Beckman Coulter
- Estufa
- Espectro UV-VIS Spectrophotometer DU*64 BECKMAN
- Incubadora para cultivos celulares shel lab CO₂ INCUBATOR
- Campana de flujo laminar industrias Figursa Mod. CFV-90
- Microscopio Confocal Modelo FV1000

7. Modelos Experimentales

La línea celular utilizada en este proyecto para la evaluación de la capacidad citotóxica de las nanopartículas fue HepG-2 (hepáticas humanas).

8. Métodos

8.1 Preparación de Nanopartículas

Para la preparación de sistemas nanoparticulados a base de PLGA, se utilizó el método de Nanoprecipitación.

Cada sistema se preparó de la siguiente manera:

En un vaso de precipitados de 15 ml se pesó la curcumina y el polímero (PLGA) indicada para dicho sistema en el diseño experimental y se adicionan 10 ml de acetona, se agita hasta disolver por completo los componentes, una vez disuelto esta será el sistema A.

Simultáneamente en otro vaso de precipitados de 50ml se preparó 20ml de PVA al 1% a pH=5 esta será la sistema B

Posteriormente se adicionó gota a gota el sistema B en el sistema A y se mantuvo en agitación constante de (200 rpm) por 10 minutos desde que se adiciono por completo el sistema B.

Una vez homogeneizado el nuevo sistema (c) y después del tiempo de agitación establecido con ayuda de un rotavapor se eliminó la acetona a (65°C, 110 rpm, 5 minutos aproximadamente). Este será el sistema (D)

Se Vertió el sistema resultante en un tubo cónico de 50ml y refrigerar a 4°C.

Para Centrifugar el sistema se preparó de la siguiente forma.

En un tubo para ultracentrífuga se agregó 5ml de glicerol, 10 ml de agua desionizada a pH=5 y 20 ml del sistema (D) y se centrifuga a 27,000 rpm por 1 hora a 4°C

Posteriormente se tomó 15 mL de cada tubo los 15mL más cercanos a la interface entre el glicerol y el agua.

Posteriormente se esterilizó por filtración con filtro tipo pirinola de 0.45 μm y se almacena a 4°C cubierto de la luz.

8.2 Cuantificación de la cantidad de curcumina y polímero de los sistemas.

8.2.1 Barrido de la Curcumina

Se prepara un stock (utilizando etanol al 80% como disolvente) de 25mg/50mL

Posteriormente se toma 1 mL y se lleva a 10 mL con etanol al 80% y obteniendo una concentración final de 0.05 mg/mL = 50 µg/mL

Se realiza el barrido.

Debido a que al realizar el barrido la longitud de onda superaba las 3 unidades de absorbancia se realizó una dilución 1:10 tomando 1 mL de la solución y aforando a 10 mL obteniendo una concentración final de 5 µg/mL

Obteniéndose un pico de: 0.6882 a 430 nm

Se realizó una curva de calibración obteniendo la siguiente ecuación:

$$Y = -0.007248X + 0.14148 \quad R^2 = 0.9994$$

$$\text{Concentracion } \mu\text{g/mL} = \frac{\text{Abs} - 0.007248}{0.14178} = 4.8028 \mu\text{g/mL}$$

$$4.8028 \mu\text{g/mL} \times \frac{1\text{mL}}{0.2\mu\text{L}} \times \frac{2\text{mL}}{1\text{mL}} = 48.0287 \mu\text{g/mL}$$

Sustituyendo en la ecuación, las lecturas obtenidas y multiplicando por los factores de dilución se obtiene una concentración final del sistema PLGA con curcumina de: 48.0287 µg/mL

8.3 Cuantificación de los sistemas de PLGA con Curcumina

- Se toma un frasco ámbar de 10ml y se deja desecando en una estufa a 30°C por 48hrs.

- Se pone a peso constante y se adicionan 5ml del sistema filtrado de nanopartículas.
- Se deja incubando 24hrs a 30°C
- Una vez que los sistemas se deshidrataron, se toma el peso
- Posteriormente se agregan 2 ml de acetonitrilo y se dejan en agitación por 4 horas en agitador oscilatorio a 175 rpm
- Una vez transcurrido el tiempo de agitación, se toman 1.5 mL y se centrifugan a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C
- Se recupera el sobrenadante y se toman 200 µL del sobrenadante y se afora a 1 mL con etanol al 80% y se toma la lectura a 430 nanómetros
- Se obtuvieron las siguientes lecturas por triplicado para el sistema de PLGA con curcumina

➤ 0.5660
➤ 0.5100
➤ 0.5010
X= 0.5256

De esto se tomaron 300µL y se diluyeron en 700mL de etanol al 70%

- Realizando los cálculos de sustitución en la ecuación y factores de dilución se obtuvo la concentración de: 68.1 µM

8.4 Exposición a células

- Se cultivan y mantienen células HepG-2 en placa de 6 pozos en condiciones estériles hasta llegar a confluencia 100% a 37°C, 5% de CO₂ y 75% de humedad
- Se realiza el marcaje de control

8.5 Determinación para la actividad de glutatión Reductasa

Células confluentes tratadas

Cosechar:

- Retirar medio de cultivo cuidadosamente

- Lavar con 1ml de PBS no estéril frío (x2)
- Adicionar 0.5mL de PBS no estéril frío
- Raspar células y colocarlas en 2 tubos Eppendorf® de 2mL (guardar uno de los tubos para determinar la actividad de glutatión peroxidasa).
- Centrifugar 12000rpm durante 10 minutos a 4°C
- Desechar Sobrenadante
- Adicionar 100µL de Buffer PE frío
- Homogenizar mecánicamente en vortex (no sonicar)
- Centrifugar 12000rpm durante 15 minutos a 4°C
- Remover el sobrenadante en tubos Eppendorf® de 200µL y conservar a -20°C La estabilidad de la enzima es de un mes
- Determinar proteínas totales

Para determinación espectrofotométrica:

El principio de basa en el monitoreo de la oxidación de NADPH ligado a la reducción de GSSG. NADPH absorbe a 340nm y su oxidación se ve reflejada por la disminución de la absorbancia a esta longitud de onda.

Reactivos:

- Buffer (PE) fosfato de potasio .02M, pH=7.0 /2mMEDTA
- GSSG 20mM Preparar cada vez, soluble en agua estéril
- NADPH 2mM disolver en Tris-HCl 10mM, pH=7, Preparar cada vez

Nota: Es importante mantener la temperatura a 30°C

Para 200µL de reacción se coloca en pozo de placa para ELISA de 96 pozos, respetando el orden:

Tabla 3 Cantidad de reactivos a utilizar para medir la Actividad de Glutatión Peroxidasa.

REACTIVOS	Microlitros (µl)
Buffer de ensayo (30°C)	100
Agua destilada (30°C)	cbp 80
Muestra	cbp 80

GSSG 20mM	10
NADPH 2mM	10

- Ajustar la cantidad de Agua y muestra para un volumen total de 200µL. colocar entre 75 y 180µg. de Proteína total ajustando a los 80µL
- Antes de leer en el espectrofotómetro, encender la Incubadora 30 minutos antes y ajustar la temperatura a 30°C, colocar dentro el buffer PE y el Agua estéril.
- Después de agregar todos los reactivos excepto el NADPH se cubre la placa con papel aluminio y se coloca en la incubadora a 30°C por 10 minutos.
- Colocar la placa en el espectrofotómetro.
- Agregar el NADPH
- Ligeramente agitar con la punta de la micro pipeta en forma circular
- Medir inmediata mente.
- Monitorear la disminución de absorbancia durante 5 minutos
- Después de adicionar el NAPH no deben transcurrir más de 15 segundos para tomar la primera lectura.
- Para los cálculos se restan los valores obtenidos del blanco menos los de la muestra y se grafican. Luego se utiliza la siguiente formula:

$$\text{Actividad GSH PX } \frac{\text{mol}}{\text{min}} * \text{ml} = \frac{m}{\epsilon} * FD$$

Donde:

m= Es la pendiente obtenida de graficar los datos

ε= coeficiente de absorción molar del NADH que es de 0.00378

FD= factor de dilución

8.6 Controles:

- Blanco debe contener todo excepto la muestra
- Control debe contener todo excepto el GSSG
- 100µL Buffer de ensayo PE
- 80µL Agua Estéril
- 10µL de GSSG
- 10µL de NADPH

8.7 Determinación para la actividad de Glutación Peroxidasa

- El principio se basa en el monitoreo de la oxidación de NADPH ligado a la formación de GSSG acoplada a la reacción de Glutación peroxidasa
- Buffer de Ensayo

8.7.1 Para la muestra

- A las células confluentes y tratadas retirar el medio de cultivo
- Lavar con PBS frío 2 veces
- Adicionar 500 µL de PBS a cada pozo, raspar, recolectar la suspensión celular obtenida y dividirla en dos tubos Eppendorf (guardar uno de los tubos para determinar la actividad de glutación reductasa).
- Centrifugar las muestras a 12 000 rpm 10' 4 °C
- Desechar sobrenadante y adicionar 50 µl de buffer de homogenización (TED) frío
- Homogenizar mecánicamente y conservar a -20 °C por un día
- Luego centrifugar a 12 000 rpm 15' 4°C
- Remover el sobrenadante, desechar el botón y separar de 10-5 µl para determinar proteínas.

8.7.2 Medición de la Actividad

El día del ensayo se deberá de preparar los siguientes reactivos y no deberán de ser usado en ensayos posteriores para evitar lecturas erróneas.

- NADPH 2 mM (deberá de usarse dentro de las 2 horas posteriores a su preparación)
- H₂O₂ 5 mM
- GSH 10mM

Para las muestras poner la cantidad equivalente a 3µg de proteínas (los microgramos pueden ser desde 2 hasta 4) en caso de que sean menos de 20 µl completar con el buffer de homogenización (TED).

Se agregan los reactivos de acuerdo al siguiente orden

Tabla 4 Cantidad de reactivos a utilizar para medir Glutatión Reductasa

REACTIVOS	Microlitros (µl)
Buffer de ensayo	126
GSH 10 mM	20
NADPH 2 mM	20
Azida de sodio 1.125M	2
Enzima Glutatión Reductasa 100 U/ml	2
Muestra	20

Para el blanco se agregan los reactivos del 1-5 y en vez de la muestra se agregan 30 μL de Buffer de homogenización (TED).

Se deja en equilibrio por 10 minutos a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se agregan 10 μL de H_2O_2 a cada muestra, el blanco **NO LLEVA PEROXIDO**.

Se toman las lecturas a partir del minuto 0 al 5

Para los cálculos se restan los valores obtenidos del blanco menos los de la muestra y se grafican. Luego se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GSH PX} \frac{\text{mol}}{\text{min}} * \text{ml} = \frac{m}{\epsilon} * FD$$

8.8 Mantenimiento de los cultivos celulares

El mantenimiento de los cultivos celulares de la línea HepG-2 se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sembraron las células en suspensión en una caja plásticas estéril para cultivo y se añadió Medio DMEM suplementado al 10% con SFB y al 2% de antibiótico (pen/strep).

Cada 72 horas o bien cuando exista un cambio de vire de color rojo a amarillo se debe cambiar medio, retirando el medio usado, lavando con PBS estéril 2 veces y posteriormente agregar el nuevo medio de cultivo.

Después de 6 a 7 días las células llegan a un estado de confluencia y posteriormente se tripsinizan para recuperar las células en suspensión y realizar los subcultivos en placas de 6 pozos.

8.9 Determinación de Proteínas totales por el método de Bradford.

Se realiza una curva estándar utilizando albumina sérica bovina (BSA) a una concentración de 5mg/ml y reactivo de Bradford diluido 1:3 (una parte de reactivo de Bradford y tres partes de agua des-ionizada).

Los sistemas de la curva estándar se preparan en microtubos de 1.5ml de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5 Cantidad de reactivos utilizada para Medir Proteínas Totales

Vol. de sol. Stock de BSA (µL)	Buffer TED o PE (µL)	Proteínas (µL/mL)	Alicuota (µL)*	Solución Diluida de Bradford (µL)	Proteínas (µg)	Proteínas (µg/mL)
0	1000	0	40	160	0	0
80	920	400	40	160	16	80
100	900	500	40	160	20	100
120	880	600	40	160	24	120
140	860	700	40	160	28	140
160	840	800	40	160	32	160
180	820	900	40	160	36	180
200	800	1000	40	160	40	200

El blanco es el primer sistema que no tiene albúmina, solo es agua y solución de Bradford.

Para la preparación de las muestras se toman los 10 μ L que se reservaron desde el tratamiento de la muestra anteriormente descrito para la determinación de proteínas y se adicionan 30ml de PBS y se adicionan 160 μ L de solución diluida de Bradford.

8.10 Microcultivos para microscopía confocal

Se trypsinizaron células HepG-2 y posteriormente se colocaron 500 μ L de la suspensión celular en unos cubre objetos cuadrados estériles sobre una caja de cultivo de 6 pozos y se adiciona a cada pozo 1000 μ L de medio de cultivo DMEM Advance suplementado con SFB al 10% y 2% de Antibiótico Estreptomicina penicilina como se muestra en el esquema:

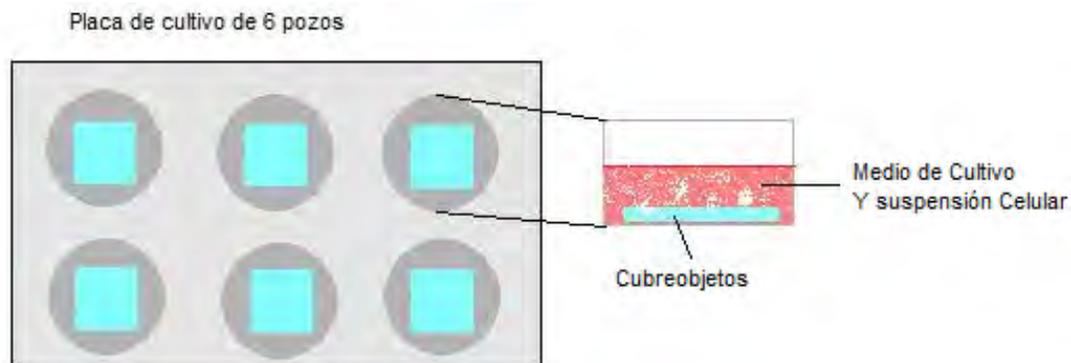


Figura 11 Preparación de microcultivo celular.

Pasadas 24 horas de la preparación del microcultivo o bien cuando estas estén en un 60% de confluencia en el cubreobjetos se realizó la exposición de 4 horas a nanopartículas con curcumina manejando 2 controles negativos, 2 dosis de 1 μ M de Curcumina contenida en las nanopartículas de PLGA y 2 dosis de 20 μ M de Curcumina contenida en las nanopartículas de PLGA.

Se colocó la placa dentro de la incubadora por 4 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 75% de humedad relativa en completa esterilidad

8.11 Preparación de laminillas para microscopia confocal.

Al término de la exposición se sacó la placa cuidándola de la luz con papel aluminio y se refrigeró a 4°C por 10 minutos.

En un cuarto parcialmente oscuro, se retira el medio de cultivo y se lava dos veces con PBS

Posteriormente se colocan sobre los cubreobjetos dos gotas de paraformaldehído al 1% dejando reposar 30 minutos.

Pasado el tiempo se lava 2 veces con PBS y se añade a los cubreobjetos 20µL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 5 minutos.

Nuevamente se lava con PBS 2 veces y se retira por completo el PBS

Posteriormente se toma un porta objetos nuevo y limpiado previamente con etanol al 70% y se coloca una gota de PVA-DABCO.

Se retira el cubreobjetos del pozo con ayuda de un bisturí y ser cuidadosos de no perder la parte con las células y colocarlo boca abajo en el portaobjetos cuidando no formar burbujas como se muestra en el diagrama.

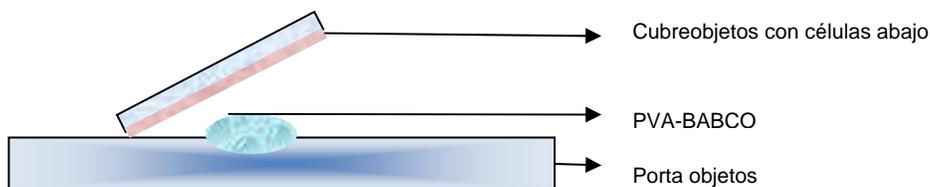


Figura 12 Esquema de montaje de Microcultivo celular

Una vez montada la laminilla se deja reposar 1 hora y posteriormente se coloca un poco de barniz transparente alrededor del cubreobjetos con el fin de que no se mueva mas el cubreobjetos.

Se deben refrigerar a 4°C y cubiertas de la luz y ser revisadas por un lapso no mayor a 3 meses.

8.12 Metodología en diagrama general.

9. Resultados y Análisis de resultados.

9.1 Exposición a células HepG-2 a diferentes concentraciones de curcumina

9.1.1 Resultados Glutación Peroxidasa.

Tabla 6: Resultado de la Actividad de Glutación Peroxidasa en cultivos expuestos a Curcumina sola y a Nanopartículas con curcumina

	Curcumina sola	NP De PLGA con Curcumina
Concentración	Actividad de glutación peróxidasa (mol/min*mL)	Actividad de glutación peróxidasa (mol/min*mL)
Control	3.07251072	2.96968726
0.2 µM	3.68165779	1.19415048
2 µM	1.73810979	1.76445572
5µM	2.18077766	1.81300909
10µM	2.36380122	2.08700762
20µM	2.84433401	2.74884257
H ₂ O ₂ 5 mM	2.04866061	2.01584598

Glutation Peroxidasa

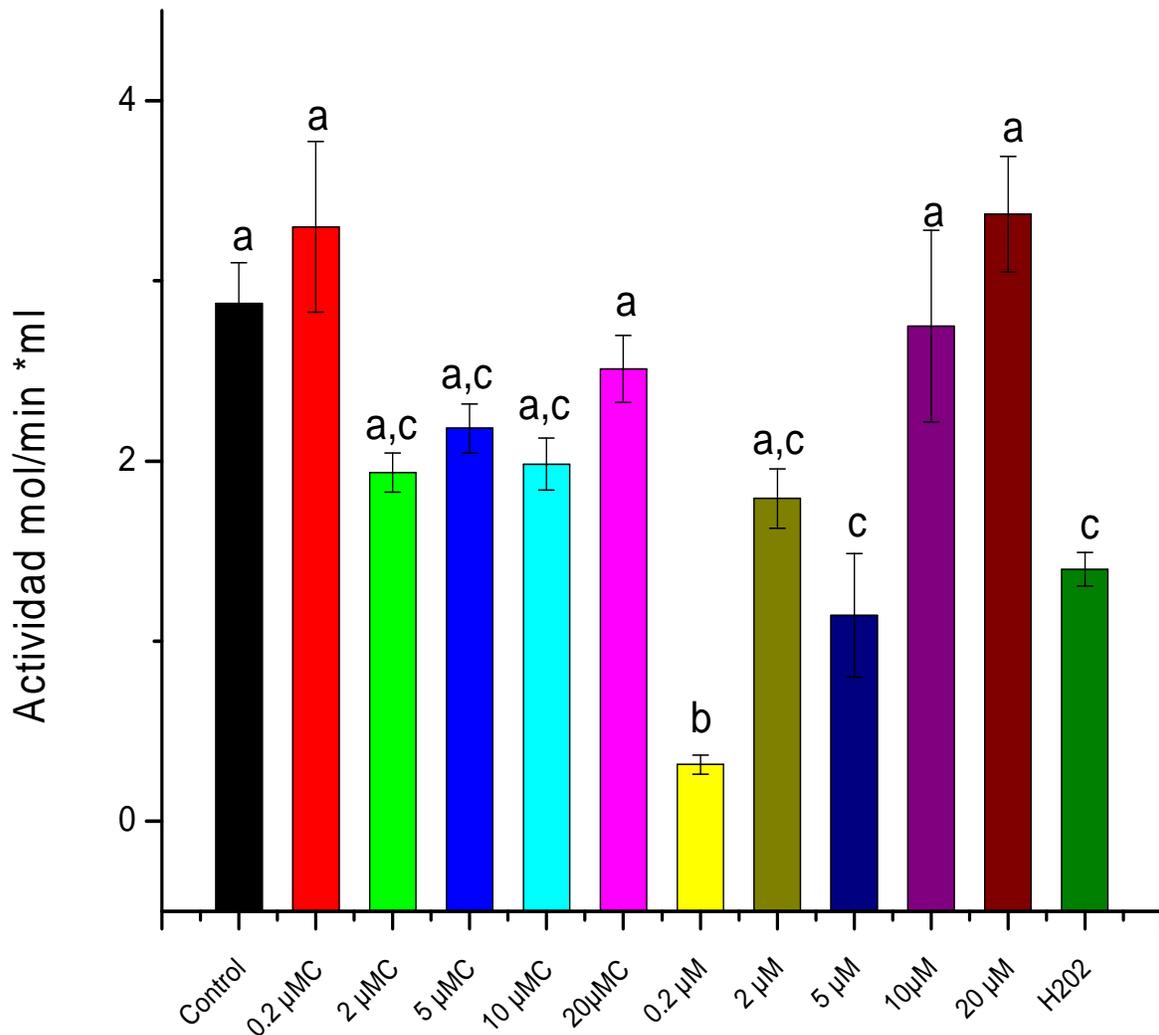


Grafico 1: Comparación de resultados de Actividad enzimática de **Glutation Peróxidasa** en (mol/min*mL) de sistemas a diferentes concentraciones de Curcumina sola (se muestran con Una "C" después de la concentración con una línea color naranja) y cargada en Nanopartículas (Línea Azul).

El análisis estadístico fue elaborado con el programa Origin Lab® 2015 en el cual se realizaron los análisis de Anova y las prueba múltiple de rango (turkey) con un nivel de confianza de 95% para determinar que si existe diferencia significativa entre la exposición con diferentes concentraciones de Curcumina sola y en nanopartículas frente a un control negativo y un control expuesto a H₂O₂ al 50mM

Las letras mostradas arriba de las barras del histograma muestran la relación que existe entre las barras, las Barras con la misma letra nos dice que no existen diferencias significativas entre ellas y cuando la letra es diferente existen diferencias significativas entre los datos analizados

Las células de la línea celular HepG-2 mostraron una disminución la actividad de la enzima glutatión peróxidasa en las concentraciones de 2, 5, 10 y 20 μM a excepción de la concentración de 0.2 μM en la que se vio un aumento de esta actividad.

Como puede apreciarse en el grafico 2 con respecto a los sistemas con solo curcumina todos presentan una relación significativa con respecto al control, por lo que se podemos decir que la curcumina por si sola en concentraciones de entre 2 y 10 μM disminuye la actividad de la enzima glutatión peróxidasa pero no de una forma significativa esto puede deberse principalmente a la baja solubilidad de la curcumina en medio acuoso y que tiene una biodisponibilidad de absorción en cuerpo de 1% aproximadamente.

Por otra parte si se observa la actividad enzimática de los sistemas tratados con las nanopartículas cargadas con curcumina se puede ver que en las primeras concentraciones la actividad es notablemente más reducida, mientras que en las últimas dos concentraciones se ve un aumento, esto se debe principalmente a que las nanopartículas efectivamente están ayudando a la curcumina a entrar a la célula. (Elio, 2014)

9.1.2 Resultados Glutatión Reductasa

Tabla 7: Resultado de la Actividad de **Glutatión Reductasa** de Curcumina sola y Cargada en Nanopartículas.

	Curcumina sola	NP De PLGA con Curcumina
Concentración	Actividad de glutatión Reductasa (mol/min*mL)	Actividad de glutatión Reductasa (mol/min*mL)
0.2 µM	2.00663738	1.55462754
2 µM	0.55555554	1.78514072
5µM	0.91717078	2.5991872
10µM	1.06629954	3.03296045
20µM	1.50872582	4.51876668
H₂O₂ 5 mM	1.02006938	2.7571449

Glutation Reductasa

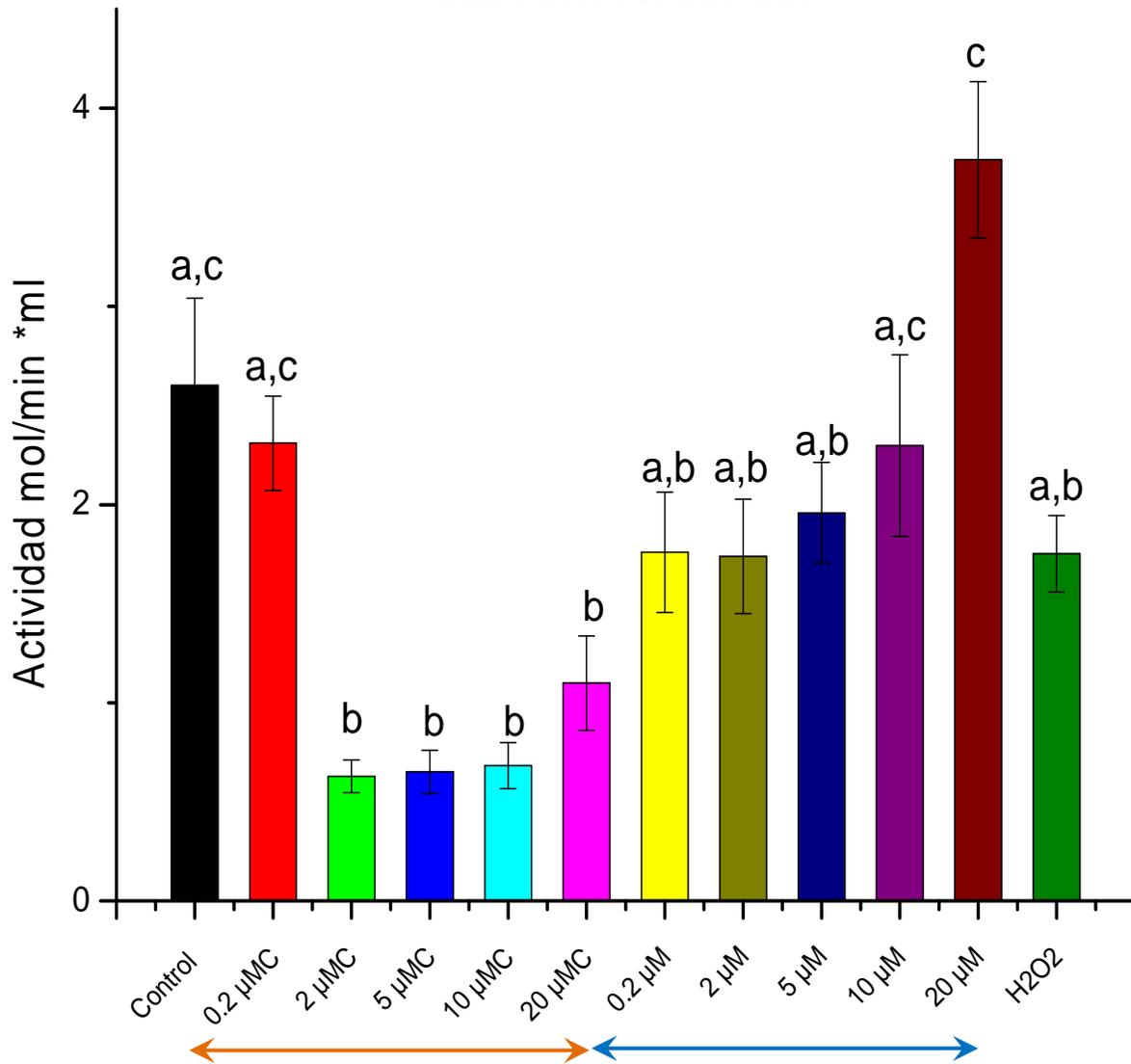


Grafico 2: Comparación de resultados de Actividad enzimática de **Glutathión Reductasa** en (mol/min*mL) de sistemas a diferentes concentraciones de Curcumina sola (se muestran con una "C" después de la concentración con una línea color naranja) y cargada en Nanopartículas (Línea Azul).

En el caso de la glutathión reductasa al observar la concentración más baja de 0.2μM podemos notar que esta es muy cercana al control y no hay una diferencia significativa esto se debe principalmente a dos razones, la baja concentración que se uso y la baja solubilidad acuosa que como ya se menciono tiene la curcumina,

esto ocasionó que existiera muy poco efecto sobre la célula principalmente y la biodisponibilidad fuera muy baja.

Por otra parte las concentraciones de entre 2 y 20 μ M de curcumina sola, si presentaron una disminución muy notoria de la actividad de la enzima GRd a diferencia de los sistemas de PLGA-Curcumina en los cuales la disminución de la actividad de la GRd se vio disminuida pero se relaciona significativamente con el control.

En relación con las nanopartículas cargadas con curcumina, se puede apreciar también que la concentración más alta 20 μ M presento un aumento de la actividad, esto puede deberse principalmente a que las nanopartículas como nanoacarreadores fueron eficaces en incorporar la curcumina a las células pero elevadas concentraciones de esta puede estar afectando el sistema oxidoreductor de la célula ya que concentraciones elevadas de curcumina, pueden presentar un efecto adverso. (Ornchuma Naksuriya, 2013)

Por último al ser comparada la actividad de las dos enzimas GRd y GPx con el control positivo de H₂O₂, en los dos casos se vio una disminución que no tiene diferencia significativa con el control negativo, esto se puede explicar debido al tiempo de exposición, ya que la actividad de las enzimas disminuye desde las primeras dos horas de exposición y va disminuyendo mas hasta las 24 hrs obteniendo una diferencia más significativa con el control negativo a una dosis de 50 mM de H₂O₂ (Tumminia SJ, 1997) Por lo que nosotros no pudimos tomar como referencia la actividad de esta exposición debido a que fue muy poco tiempo de exposición, pero si podemos notar que el resultado fue en base a la literatura mencionada con una disminución en ambas enzimas.

Cabe mencionar que es importante abundar en el estudio de los efectos biológicos asociados a la exposición de las Nanopartículas de interés en este trabajo con objeto de conocer otros mecanismos moduladores oxido reductores que contribuyan a la homeostasis celular. Este trabajo sentará las bases para

continuar su estudio en el laboratorio de Toxicología Celular de la UIM en la FES-Cuautitlán.

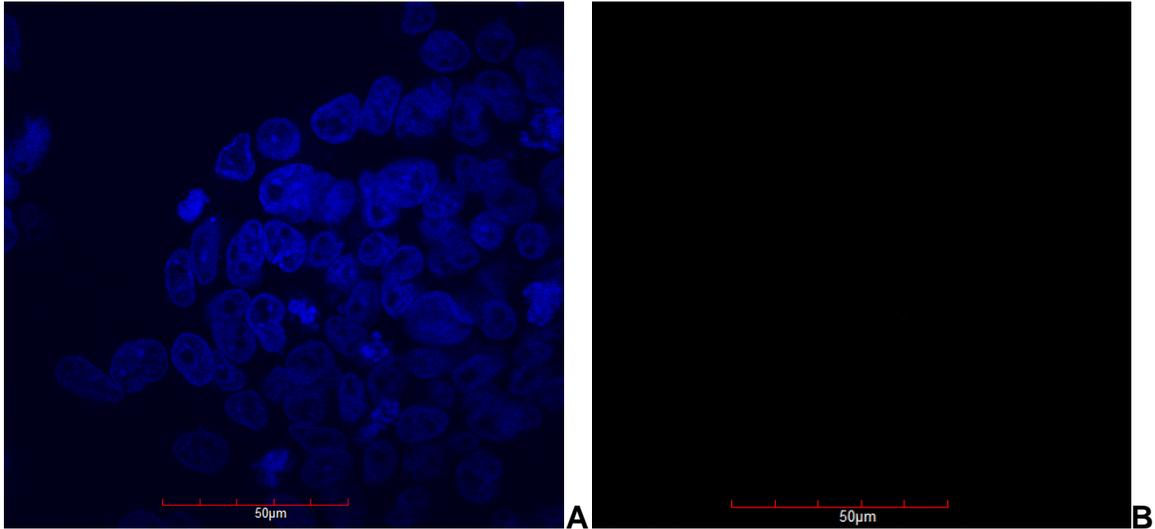
Las nanopartículas discutida en esta sección tienen como objetivo principalmente lograr una mayor solubilización de la curcumina, pero al mismo tiempo proteger la curcumina contra la inactivación por hidrólisis. La formulación debe estar preparada y cargada por las Nanopartículas de manera eficiente y debe conservar curcumina para el período de tiempo requerido. Algunas formulaciones son dirigidas hacia una liberación prolongada de la curcumina, mientras que otras tienen mecanismos adicionales para la entrega celular o liberación intracelular.

Con objeto de conocer si las Nanopartículas en estudio son incorporadas a las células hepáticas, se realizó el análisis de la localización de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina por microscopía confocal y Considerando la propiedades fluorogénicas de la curcumina se obtuvieron preparaciones celulares que después de contrateñir al núcleo con DAPI pudimos ver su distribución.

Las células se expusieron a Nanopartículas que contenían curcumina. La cantidad total de curcumina representaba dos dosis, una baja de 0.2 μM y una dosis alta de 20 μM y sus respectivos controles negativos a los cuales solo se les expuso con DAPI para poder observar el núcleo.

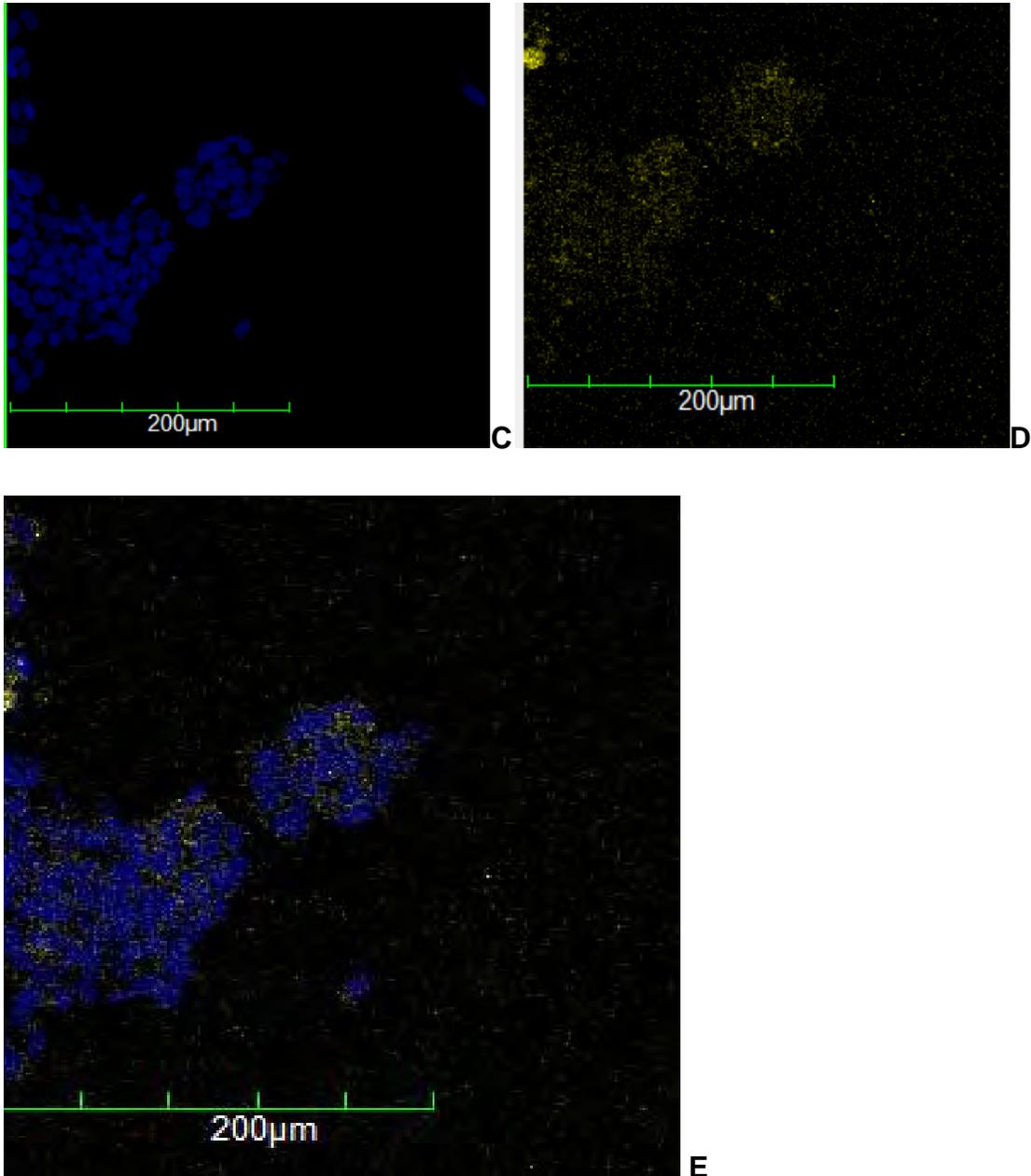
10 Imágenes

10.1 Controles negativos

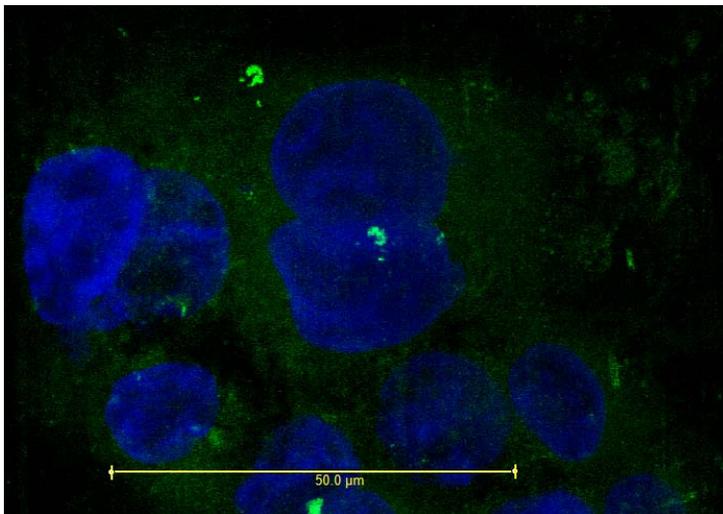
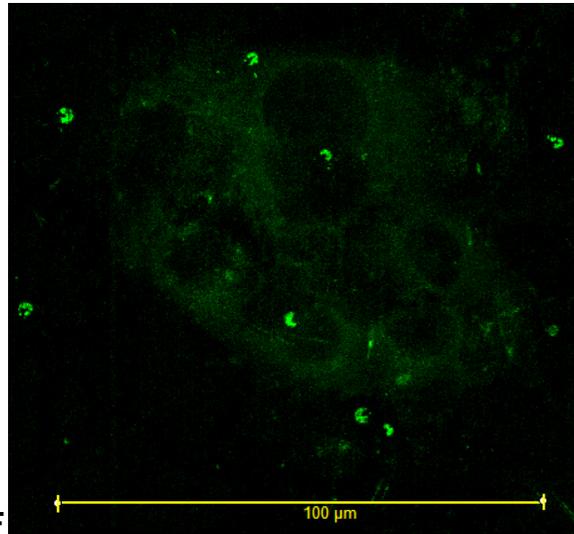
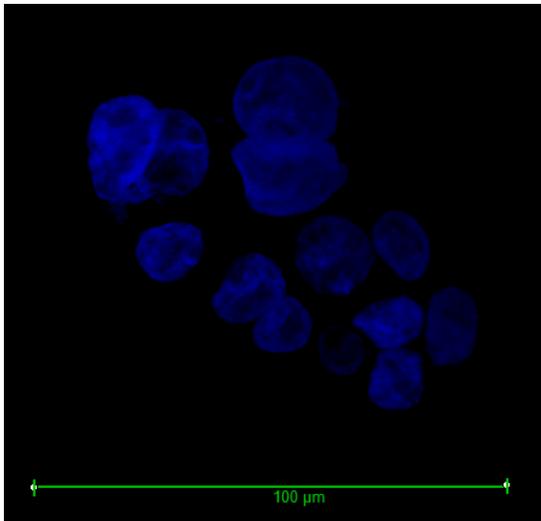


Se muestran los controles negativos de microcultivos de Células HepG-2 en a la izquierda (A) se observan células vistas a 397 nm y a la derecha (B) el mismo campo pero visto a 514nm longitud de onda de la curcumina con un aumento de 40X Concentración de 0.2 mM

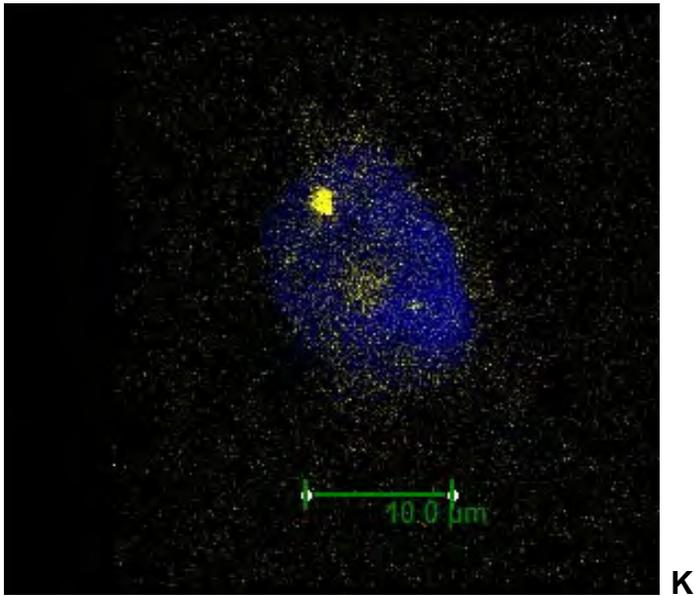
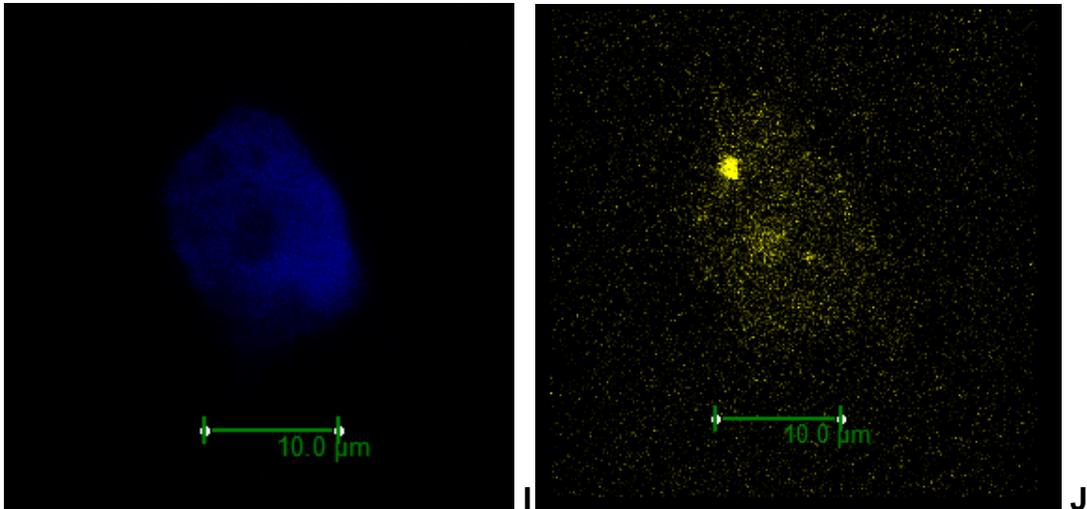
10.2 Dosis Baja



Se observan las imágenes obtenidas con un aumento de 20x en la imagen superior izquierda (C) se observa los núcleos de las células a 397 nm la de la parte superior derecha (D) a 514 la longitud de onda de la curcumina y la imagen inferior (E) muestra la co-localización de las dos imágenes.



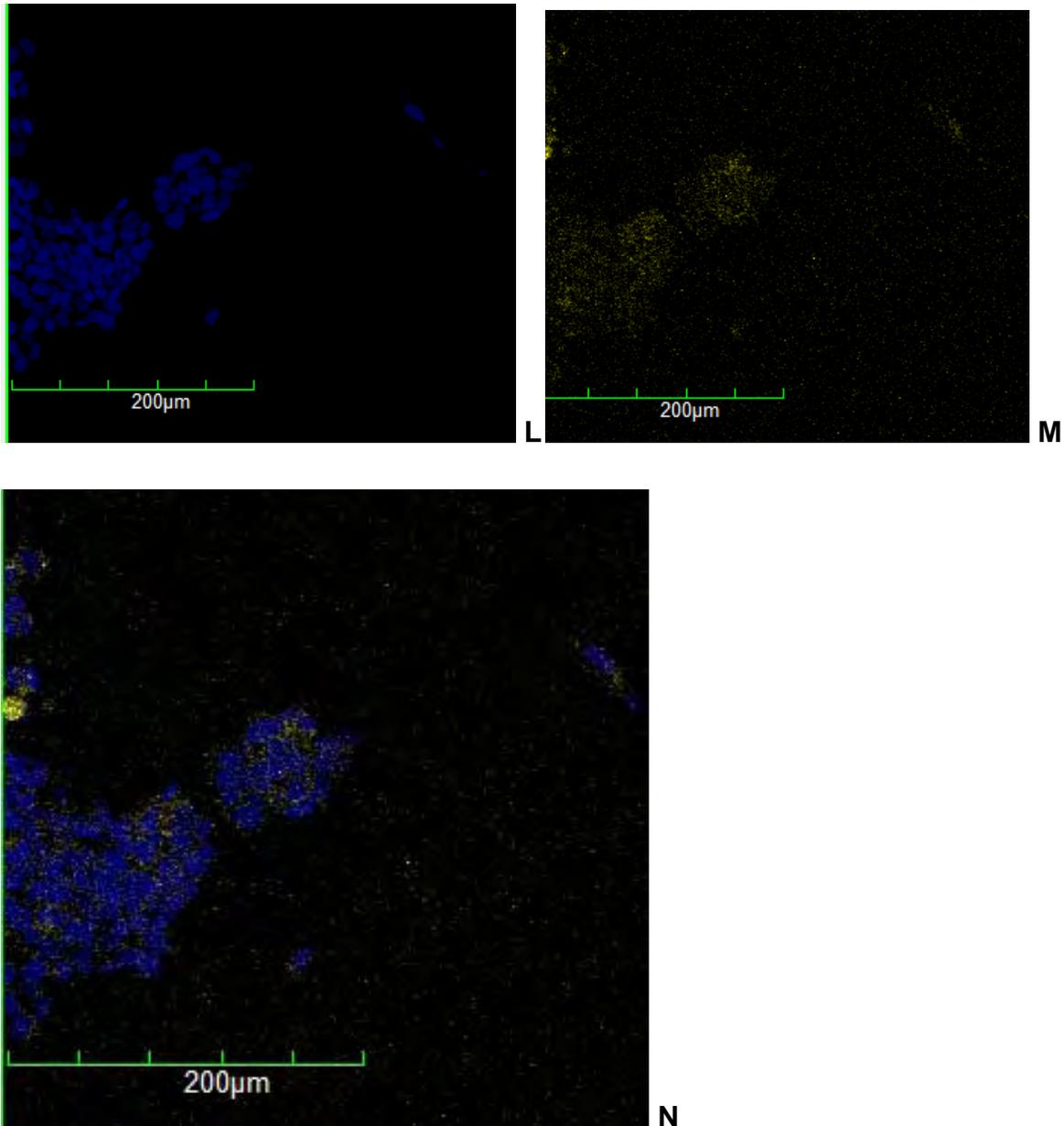
De igual forma y en el mismo orden se observan las imágenes obtenidas con un aumento ahora de 40x en la imagen superior izquierda (F) se observa los núcleos de las células a 397 nm la de la parte superior derecha (G) a 514 nm la longitud de onda de la curcumina y la imagen inferior (H) muestra la co-localización de las dos imágenes a un aumento de 60X.



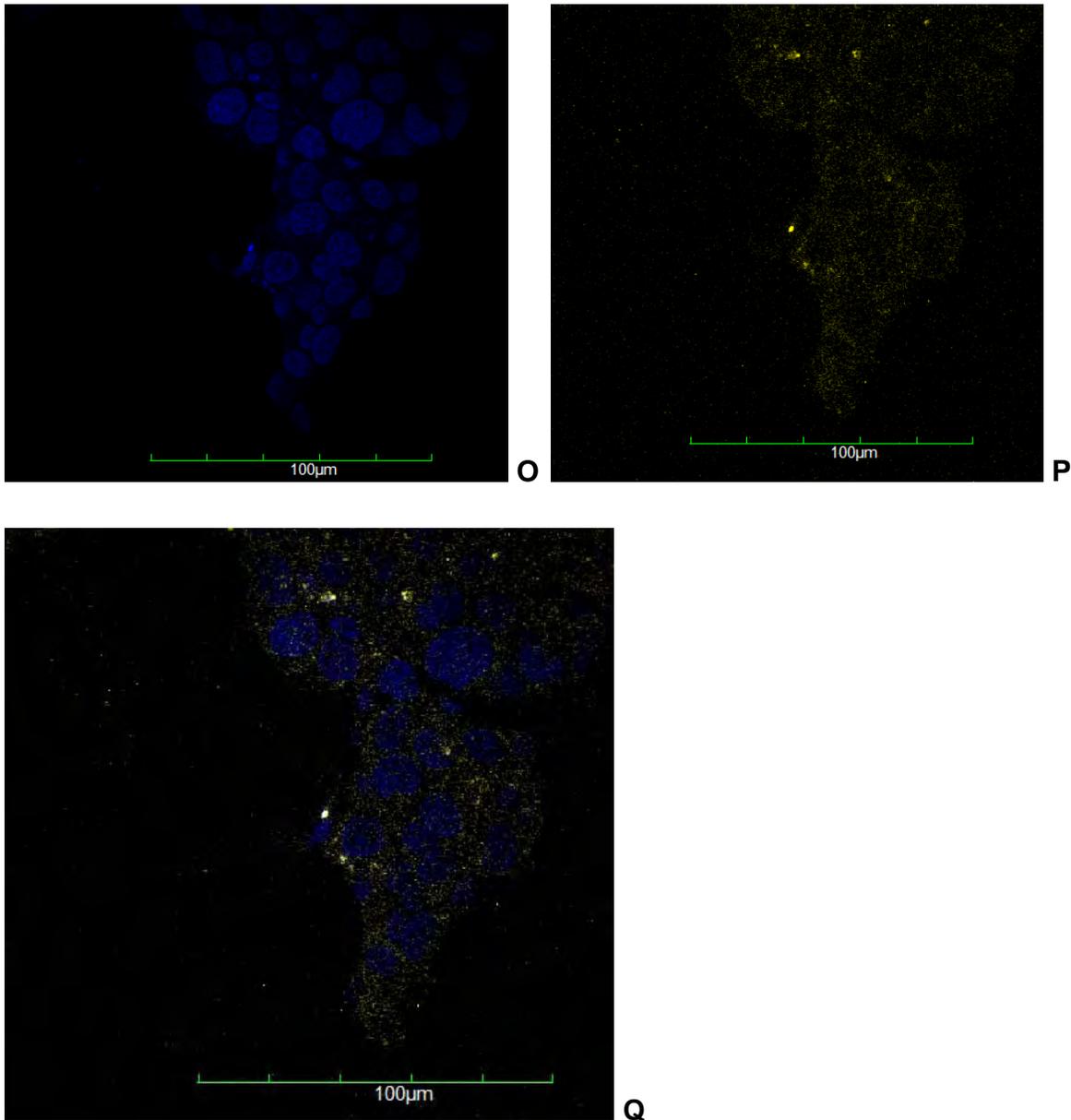
Celulas tratadas a dosis baja 0.2 mM Imágenes obtenidas con un aumento de 100x en la imagen superior izquierda (I) se observa los núcleos de las células a 397 nm la de la parte superior derecha (J) a 514 nm la longitud de onda de la curcumina y la imagen inferior (K) muestra la co-localización de las dos imágenes.

10.3 Dosis Alta

Hepg2 concentración de 20 mM



Células Tratadas a una dosis Alta **20 mM** Imágenes obtenidas con un aumento de 20x en la imagen superior izquierda (L) se observa los núcleos de las células a 397 nm la de la parte superior derecha (M) a 514 nm la longitud de onda de la curcumina y la imagen inferior (N) muestra la co-localización de las dos imágenes.



Tratamiento de las células a Dosis alta **20mM** De igual forma y en el mismo orden se observan las imágenes obtenidas con un aumento ahora de 40x en la imagen superior izquierda se observa los núcleos de las células a 397 nm la de la parte superior derecha (O) a 514nm la longitud de onda de la curcumina (P) y la imagen inferior (Q) muestra la co-localización las dos imágenes a un aumento de 60X.

Como se puede apreciar en las imágenes tomadas por el Microscopio confocal F10, se observa clara mente los núcleos teñidos de azul a la longitud de onda del DAPI y mostrando que estos se encontraban en perfectas condiciones. Debido a el tipo de microscopio y el software que emplea no fue posible capturar la imagen en campo claro para delimitar el área de la célula. Así mismo en la imagen del control tomada a la longitud de onda en la que emite la curcumina, no se observa nada, lo que fue muy bueno ya que demuestra que no existió interferencia de emisión de moléculas contenidas en la célula y que pudiera hacer interferencia con la curcumina y se tuviese que usar otro colorante para realizar la contratinción.

En el caso de la dosis baja se puede apreciar que las células están en buen estado, y al observar a la longitud de onda de la curcumina es claro que se encuentran dentro de estas. Al observar la imagen más cercana a 100x.

En cuanto a la dosis Alta, cabe señalar que fue más difícil conseguir imágenes de esta concentración pero de igual forma fue evidente la incorporación dentro de la célula e incluso en el núcleo. Aunque probablemente a esta concentración causaba efectos adversos en la célula por lo encontrar células viables era más difícil.

Es importante señalar que se realizaron repeticiones de este ensayo en el cual en el primero se pudo observar claramente la incorporación de las nanopartículas en el núcleo de las células HepG-2 y reafirmarlo al observar la animación en 3D para quitar la duda de si realmente estaban las nanopartículas dentro del núcleo o solo se sobrepone sobre este y al ver en 2D se veía encima de este. Para el segundo experimento se usó otro lote de nanopartículas el cual fue preparado con diferentes condiciones de preparación debido a la falla del rotavapor utilizado para la evaporación de la acetona y se disminuyeron las revoluciones de agitación lo que ocasionó probablemente que se obtuvieran tamaños de nanopartículas mas grandes a pesar que fueron filtradas para homogeneizar su tamaño, lo que afecto la entrada en el nucleo al observarlas de nuevo en el microscopio confocal pero si se mostraban mas abundantes alrededor de este.

11. Conclusión

Se lograron conocer los efectos de la actividad enzimática de glutatión reductasa (GRd) y glutatión peróxidasa (GPx) asociados a la exposición de las de nanopartículas preparadas a base de PLGA con curcumina y la comparación con curcumina sola.

La GRd es una enzima de gran importancia para la célula debido a su participación en la regeneración del GSH, el cual como hemos visto, resulta de extrema utilidad para la defensa autooxidante ya que su participa en los mecanismos para eliminar las especies reactivas del oxígeno. Su importancia de la GRd y la Gpx se constata en el papel que ésta desempeña en la etiología y fisiopatología de muchas enfermedades de importancia médico-social, en las que su estudio puede ser utilizado para una mejor comprensión de estas entidades con fines diagnósticos, pronósticos y hasta terapéuticos.

Consiguió confirmar los efectos antioxidantes que tiene la curcumina sobre las células hepáticas y la efectividad que tiene al administrarla en nanopartículas de PLGA como nanoacarreadores

Se logró ver el efecto de la enzima glutatión Peroxidasa y la disminución evidente que tuvo cuando fue expuesta a dosis baja de nanopartículas cargadas con curcumina a diferencia de la glutatión reductasa la cual mostro mejor benefico al exponerla por si sola a dosis baja.

Se consiguió observar la internalización de las nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina por medio de microscopia confocal por lo que se concluye que son excelentes nanoacarreadores de curcumina.

Referencias

Alvarez-Lemus, M. (2012). Nanotecnología y cáncer: aplicación al tratamiento de tumores cerebrales. *Neurociencia (Mex)* , 7 (2), 102-109.

Alves MP, G. S. (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications.

Arce, S. R. (13 de 4 de 2015). *Facultad de Medicina Veterinaria UNAM*. Recuperado el 20 de 04 de 2015, de Enzimas: Dr. Santiago René Anzaldúa Arce

Ashish M. Kam, G. S. (2007). Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-KB and nuclear factor-KB-regulated gene products in IFN- α -sensitive and IFN- α -resistant human bladder cancer cells. *American Association for Cancer Research* , 1022-1030.

Barreto, C. Á. (2011). Visión general de la nanotecnología y sus posibilidades en la industria de alimentos. *ReCiTeIA* , 46-48.

Buzea Cristina, P. I. (2007). Nanomaterial and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases vol.2* , 18-21.

CNyN-UNAM. (2010). *¿Qué es la Nanotecnología?* Recuperado el 9 de marzo de 2015, de <http://www.nanolic.unam.mx/>

Colvin., V. L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology* , 1166.

Dorado Martínez, R. V. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Facultad de Medicina UNAM* , 46 (6), 229-235.

Duncan, G. (2011). Nanomedicine under the microscope. *Molecular Pharmaceutics* , 8 (6), 2101-2141.

Elio, C. P. (2014). La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"* .

Gil, F. (2008). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. . *Facultad de Medicina de la Universidad de Granada*.

Gutiérrez, U. (2015). *Laboratorio De Microscopio Confocal*. Recuperado el 5 de Mayo de 2015, de Universidad Nacional De Colombia: <http://www.stri.si.edu/espanol/investigaciones/microscopia/confocal/index.php>

Hans M. L., L. A. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Opinion in Solid State and Materials* , 6, 319-327.

Hirenkumar K. Makadia, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable. *The journal of polymers, Review* , 1378,1380-1381,1389.

Horacio Reyes, H. N. (2008). LA NANOTECNOLOGÍA Y SUS RIESGOS: EL NACIMIENTO DE LA NANOTOXICOLOGÍA. *Razón y Palabra* (68).

Jayaraj Ravindran, S. P. (2009). Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? (M. E. Morris, Ed.) *American Association of Pharmaceutical Scientists* , 11 (3).

Jinghua Duana, Y. Z. (8 de Septiembre de 2010). Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* , 211-220.

John Wiley e hijos, Inc. (1999). Analysis of Glutathione-Related Enzymes. *Current Protocols in Toxicology* , 7.1.1-7.1.32.

John Wiley, S. (1999). Assessment of the Activity of Antioxidant Enzymes. *Current Protocols in Toxicology* , 7.2.1 - 7.2.4.

Jörg, K. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *El Sevier* .

Jorge Limón-Pacheco, M. E. (8 de 10 de 2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* , 137–147.

- K Donaldson, V. S. (2004). Nanotoxicology. *Toxicology* , 727–728.
- Llabot Juan, P. D. (2008). Nanopartículas Poliméricas Sólidas . *Farmacotecnia* , 40-47.
- Ma T. Frejo, M. J. (2011). Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina Balear* , 26 (2), 37-39.
- Manuel Repetto, G. R. (2009). *Toxicología Fundamental* (4 ed.). España: Diaz de Santos.
- Najeh Maissar Khalil, T. C. (28 de Junio de 2012). Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* , 353-359.
- Najeh Maissar Khalil, T. C. (2013). Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* , 353– 360.
- Ornchuma Naksuriya, S. O. (2013). Review Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* (35), 3365-3383.
- Patrick, M. J. (1995). Site specific microencapsulated drug targeting strategies-liver and gastro-intestinal tract targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 247-249.
- Preetha Anand, H. B. (1 de Septiembre de 2009). Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology* .
- Prego, E. C. (2006). La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"* .

RED ESPRESS. (21 de Agosto de 2015). *Alimentos naturales que luchan contra el cáncer de próstata*. Recuperado el 07 de Septiembre de 2015, de NATURAL.LUM: <https://naturalum.wordpress.com>

Reyes Horacio, N. H.-D. (2009). LA NANOTECNOLOGÍA Y SUS RIESGOS: EL NACIMIENTO DE LA NANOTOXICOLOGÍA. (I. T. Superiores, Ed.) *Razón y Palabra* , 14 (68), 2-5.

ROCHA FORMIGA, A. E.-H. (2009). Nanosistemas a base de poliésteres. *Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra* , 42-44.

Ronald J. Neufeld, A. J. (2006). Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems Catarina Pinto Reis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* , 53-65.

Stransky B, B. J.-M. (2007). Modeling cancer: integration of "omics" information in dynamic systems. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* .

Torres, D. (mayo de 2015). LA MICROSCOPÍA. Recuperado el 2015 de Mayo de 5, de HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR CÉLULAS Y TEJIDOS: http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_7.htm

Tumminia SJ, C. C. (1997). A comparison of antioxidant enzyme activities in organ-cultured rhesus monkey lenses following peroxide challenge. *Laboratory of Mechanisms of Ocular Diseases* , 845-851.

UNESCO. (2007). Ética y política de la nanotecnología.

Yang K, L. L. (2007). Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa*. *LC-MS/MS. J LC-MS/MS. J Chromatogr B* , 2007;853:183-9.

Zhu minpeng, L. s. (2012). The Stability of Curcumin and Drug-Loading Property of Starch Microspheres for It. *International Conference on Biological and Biomedical Sciences* , 12, 44-48.

Zhu minpeng, L. s. (2012). The Stability of Curcumin and Drug-Loading Property of Starch Microspheres for It. *International Conference on Biological and Biomedical Sciences Advances in Biomedical Engineering* , 9, 44-48.