



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Evaluación de la capacidad antioxidante de
Nanopartículas de Quitosán con Glutación en cultivos
organotípicos de hígado de rata Wistar, expuestos en
concentración citotóxica de Etanol**

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciado en Farmacia**

**PRESENTA:
Francisco Rodolfo Castañeda Soto**

**TUTOR
Dr. Roberto Díaz Torres**



**UNAM
CUAUTITLÁN**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2022



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.



Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT)

Clave del proyecto: IN214321



Este proyecto se realizó con la extracción del Hígado de rata wistar, por lo que se ocuparon las ratas control del proyecto "Efecto de la administración intraarticular de nanopartículas de quitosán con glutatión, en osteoartritis" de la alumna de M. en C. Iliane Zetina Marin con fuente de financiamiento PAPIIT-DGAPA-UNAM con clave IN219715 y clave de CICUAE: C 18_02.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios de México.

A la hermosa Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en especial al Departamento de Tecnología Farmacéutica y al Laboratorio Experimental Multidisciplinar de Farmacia ya que aquí me forje como Farmacéutico y me hizo amar las áreas de Tecnología Farmacéutica y Desarrollo Farmacéutico.

A mis asesores la Dra. Patricia Ramírez Noguera y el Dr. Roberto Días Torres, son unos excelentes profesionistas de los cuales gracias a ellos adquirí demasiados conocimientos. Dra. Paty le agradezco mucho por explicarme y asesorarme con la parte biológica, gracias Dr. Roberto por brindarme sus conocimientos de Desarrollo Farmacéutico. Los dos forman un gran equipo, siempre les voy a tener una gran admiración, cariño y respeto.

A mi Coasesor el M. en C. Omar Rodrigo Guadarrama Escobar, agradezco la ayuda que me proporcionaste al enseñarme las técnicas de laboratorio que se utilizaron en este proyecto. Creo que hicimos un buen equipo de trabajo, te considero un excelente amigo, y sabes que siempre contarás con mi apoyo.

A los estudiantes de maestría y doctorado del laboratorio 9, en especial a la M. en C. Laura Denise López Barrera que gracias a sus consejos, regaños y asesorías, deje de hacer cosas extrañas y fue un gran apoyo, de verdad te agradezco mucho, te deseo lo mejor, sé que serás una gran investigadora y me dará gusto saber de tus grandes logros.

Al laboratorio 9 de Toxicología celular de la Unidad de Investigación Multidisciplinar, porque dentro de sus instalaciones pude desarrollar este proyecto de investigación, además de que adquirí nuevas técnicas de laboratorio así como conocimientos de nuevos sistemas de liberación.



Dedicatorias.

A mí padre Asunción Castañeda Díaz, gracias a usted he podido lograr terminar una carrera universitaria y espero que se encuentre orgulloso de que su hijo, lo quiero mucho espero regrese pronto y deseo que la vida me permita pasar más tiempo a su lado.

A mi madre Sabina Soto Cruz, gracias mami por ser mi mayor apoyo la quiero mucho, por usted es que me motive a seguir estudiando, ya que siempre quiso tener un hijo universitario, y me alegra que yo sea el que le de esa alegría, ahora yo me ocupare de usted, ya que ya hizo mucho por mí, me toca pagarle todos los sacrificios que realizo para que yo pudiera cumplir mi sueño.

A mi hermana Karina muchas gracias hermanita hermosa tus eres una mujer brillante que siempre lucha por mi mami y por mí, y la verdad me siento muy orgulloso de ti porque a pesar de la edad no te rendiste y retomaste tus estudios. Sigue adelante y veras que tú también tendrás una carrera universitaria.

A mis mejores amigos de la FESC Mike, Sofi, y kari saben que los quiero mucho, siempre estuvimos apoyándonos durante toda la carrera, espero que siempre seamos excelentes amigos. Les deseo lo mejor en su vida profesional.

A Sergio Rojas, gracias por estar conmigo en los momentos difíciles, y brindarme toda esa confianza y amor que me demuestras día a día, eres el hombre que me ha enseñado que el amor existe. Gracias por todo, te amo demasiado.

“En este ocaso de mi vida sólo un deseo me queda: la dicha de mi país, la dicha de los míos”

-Porfirio Díaz-



Índice	
1	Objetivo General..... 1
1.1	Objetivos Particulares 1
2	Hipótesis 1
3	Justificación 1
4	Introducción 2
5	Marco Teórico 3
6	Historia de la Nanotecnología y la Nanomedicina..... 3
7	Definición de Nanopartículas..... 4
8	Ventajas del uso de nanopartículas 5
9	Tipos de nanoestructuras..... 5
9.1	Nanopartículas 6
9.2	Micelas poliméricas 6
9.3	Liposomas 7
9.4	Quantum dots..... 7
9.5	Dendrímeros..... 8
9.6	Nanotubos de carbono 8
10	Métodos de preparación de nanopartículas 9
10.1	Nanoemulsiones con el método de alta energía..... 9
10.2	Emulsificación por evaporización del disolvente..... 10
10.3	Síntesis de Nanopartículas por Salting-Out..... 10
10.4	Síntesis de Nanopartículas por polimerización interfacial..... 10
10.5	Gelación Ionotrópica..... 11
10.6	Método de doble o múltiple emulsión..... 11
11	Caracterización de nanopartículas 11
11.1	Tamaño de partícula..... 12
11.2	Dispersión de luz dinámica..... 12
11.3	Microscopía 13
11.4	Microscopía electrónica de barrido..... 13
11.5	Microscopía electrónica de Transmisión..... 13
11.6	Potencial Z..... 14
11.6.1	Modelo de la doble capa 14
12	Nanotoxicología..... 14

13	Biomarcadores de exposición.	15
14	Biomarcadores de Efecto	15
15	Biomarcadores de susceptibilidad	15
16	Citotoxicidad	16
17	Estrés Oxidativo	16
17.1	Radicales libres y especies reactivas de oxígeno	16
17.1.1	Formación de Radicales libres.	18
17.2	Peroxidación lipídica.	19
17.3	Métodos de evaluación del estrés oxidativo	19
17.3.1	Evaluación de proteínas método de Bradford	23
17.3.2	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	23
17.3.3	Cuantificación de Glutatión por el método de Ellman	24
18	Sistema de defensa contra las especies reactivas de oxígeno.	24
18.1	Sistema de defensa antioxidante enzimático	25
18.1.1	Superóxido dismutasa	25
18.1.2	Catalasa	25
18.1.3	Glutatión peroxidasa.	25
18.2	Antioxidantes no enzimáticos	25
18.2.1	Vitamina C.	25
18.2.2	Flavonoides polifenólicos.	26
18.2.3	Glutatión.	26
19	Cultivos celulares.	27
19.1	Cultivos primarios.	27
19.2	Cultivos secundarios	27
19.3	Cultivos continuos o líneas celulares.	27
20	Cultivo de órganos	28
21	Explantes primarios	28
22	Cultivos organotípicos	28
23	Medios de Cultivo	28
24	Hígado de rata	28
24.1	Anatomía	29
24.2	Fisiología celular	29
24.3	Hepatocitos.	30

24.4	Los sinusoides	30
24.5	Células de Kupffer	30
24.6	Células Estrelladas o Células de Ito	30
24.7	Células de Pit	30
24.8	Matriz Extracelular	31
25	Capacidad de Detoxificación	31
25.1	Capacidad antioxidante del hígado.....	32
25.2	Hígado detoxificador:	32
26	Etanol.....	33
26.1	Toxicidad del etanol.....	33
26.1.1	Intoxicación Aguda.....	33
26.1.2	Intoxicación crónica.....	33
26.2	Toxicocinética – Absorción	33
26.3	Toxicocinética- Distribución.....	34
26.4	Toxicocinética-Biotransformación.....	34
26.5	Toxicocinética – Excreción.....	35
27	Sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo hepático del etanol.....	35
27.1	Alcohol Deshidrogenasa	35
27.2	MEOS (P450 CYP2E1)	36
27.3	Catalasa- alcohol peroxidasa	36
28	Glutación.....	37
28.1	Mecanismos de transporte de GSH en el hepatocito	39
28.2	Detoxificación de xenobióticos por GSH.....	40
28.2.1	Glutación S-transferasa.....	40
28.2.2	Glutación como indicador de estrés oxidativo.....	41
28.3	Función antioxidante.....	41
29	Materiales y Métodos.....	43
	Elaboración de nanopartículas de Quitosan - Glutación reducido	43
29.1	Elaboración de nanopartículas control de Quitosan.....	43
29.2	Caracterización de Nanopartículas.....	44
29.2.1	Concentración de Nanopartículas y Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE).....	44
29.2.2	Determinación del tamaño de partícula	44

30	Exposición Tratamientos en cultivos organotípicos de hígado de rata en base al esquema experimental.....	44
30.1.1	Preparación de cultivos organotípicos.....	44
30.1.2	Determinación de concentración de resazurina en cultivo organotípico de hígado de rata	45
30.1.3	Viabilidad de Tejido.....	45
30.1.4	Técnica de resazurina	46
30.2	Curva de citotoxicidad de Etanol.....	46
30.3	Curva de citotoxicidad de Nanopartículas de Quitosan y Quitosan-Glutatión reducido.....	47
30.4	Exposición de Nanopartículas después de la exposición de etanol	48
30.5	Tratamiento de la muestra	49
30.5.1	Determinación de Proteínas.....	49
30.5.2	Determinación de actividad enzimática Catalasa.....	50
30.5.3	Determinación de GSH.....	50
30.5.4	Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	50
30.6	Análisis estadístico	50
31	Resultados y Discusión	51
31.1	Caracterización de Nanopartículas.....	51
31.1.1	Tamaño.....	51
31.1.2	Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	52
31.2	Evaluación de la capacidad Antioxidante de Nanopartículas en cultivo Organotípico de hígado de rata Wistar	54
32	Conclusiones	66
33	Perspectivas.....	66
34	Referencias Bibliográficas	67

Índice de Figuras.

Figura 1 Escala Nanométrica que relaciona el tamaño de algunos tipos de nanopartículas y diferentes estructuras	5
Figura 2 Principales nanopartículas poliméricas: Nanoesferas y nanocápsulas	6
Figura 3 Micela polimérica	6
Figura 4 Micela polimérica	7
Figura 5 Quantum dots.....	7
Figura 6 Estructura general de un dendrimero	8
Figura 7 Diversas estructuras de Carbono	9
Figura 8 Dispersión de la luz	12
Figura 9 Diferencias entre Microscopia electrónica de Transmisión y Microscopia electrónica de barrido.	13
Figura 10 Modelo de la doble capa	14
Figura 11 Representación del estudio de la nanotoxicología.	15
Figura 12 Representación metabólica de las especies reactivas del oxígeno.(Imagen con modificación)	19
Figura 13 Reacción del MDA (Malondialdehído) con Ácido Tiobarbitúrico (TBA).....	23
Figura 14 Reacción de formación de color del reactivo de Ellman con grupos sulfhidrilo.	24
Figura 15 vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos.	26
Figura 16 Esquema cultivo celular: cultivo primario y cultivo secundario	27
Figura 17 Cara visceral del hígado.....	29
Figura 18 Arquitectura del Itejido hepático.....	31
Figura 19 Estructura química del etanol	33
Figura 20 Biotransformación del etanol en el hepatocito.....	35
Figura 21 Rutas metabólicas de la biotransformación del etanol (Imagen con modificación)	37
Figura 22 Estructura química del glutatión.....	37
Figura 23 Transporte mitocondrial de GSH.	39
Figura 24 Mecanismos de transporte GSH y de ácido glutámico (Glu), cisteína (Cis) y glicina (Gly) en el hepatocito.	40
Figura 25 Conjugación con GSH y detoxificación de xenobióticos a través de la vía del ácido mercaptúrico.	41
Figura 26 Función antioxidante de GSH.	42
Figura 27 Cortes de tejido hepático.....	44
Figura 28 Formación de las Nanopartículas de Quitosán - GSH.....	52
Figura 29 Señalización de la Biotransformación de Etanol	58
Figura 30 Efecto del etanol sobre células hepáticas	59
Figura 31 Biotransformación por Vía de catalasa.....	61
Figura 32 Estructuras de GSH.....	63
Figura 33 Acción del GSH sobre la biotransformación de Etanol.....	64
Figura 34 Aductos de proteínas	65

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación y abreviatura de los radicales libres	17
Tabla 2 Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección Especies Reactivas de oxígeno y Nitrógeno	20
Tabla 3 Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección Especies Antioxidantes ⁽⁵⁷⁾	21
Tabla 4 Principales métodos usados para identificar a una célula muerta y diferenciarla de una célula moribunda	22
Tabla 5 Tratamientos utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante de NP- NQ-GSH.....	49
Tabla 6 Concentraciones de los diferentes tratamientos utilizados.....	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Tamaño de Nanopartícula de Quitosán con Glutación.....	51
Gráfico 2 Tamaño de Nanopartículas de Quitosán.....	51
Gráfico 3 Viabilidad del cultivo organotípico de hígado de rata Wistar, expuesto a diferentes horas de incubación.....	54
Gráfico 4 Curva de citotoxicidad de cultivo organotípico de hígado de rata Wistar, expuesto a diferentes concentraciones de etanol, por 24 horas de incubación.....	55
Gráfico 5 Efecto citotóxico en el cultivo organotípico de hígado de rata Wistar inducido por etanol durante 24 horas.....	55
Gráfico 6 Citotoxicidad de cultivo organotípico de hígado de rata Wistar, expuesto a diferentes concentraciones de nanopartículas de Quitosán, por 24 horas de incubación.....	56
Gráfico 7 Viabilidad de cultivo organotípico de hígado de rata wistar, expuesto a diferentes concentraciones de NP-Q-GSH por 24 horas de incubación.....	56
Gráfico 8 Evaluación de la capacidad antioxidante de NP-Q-GSH, expuestos por 24 horas de incubación.....	57
Gráfico 9 Evaluación de la Actividad de Catalasa.....	61
Gráfico 10 Evaluación de la Actividad de GSH	62
Gráfico 11 Evaluación de la Actividad de TBAR.....	64



Símbolos y abreviaturas

NP	Nanopartículas	GSH	Glutación Reducido
Q	Quitósán	GSSG	Glutación Oxidado
GSH	Glutación Reducido	GPx	Glutacion Peroxidasa
EtOH	Etanol	ADL	Alcohol deshidrogenasa
NP-Q	Nanopartículas de Quitósán	MEOS	Sistema oxidativo microsomal
NP-Q-GSH	Nanopartículas de Quitósán- Glutación Reducido	NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
EtOH - NP-Q	Nanopartículas de Quitósán, adicionadas después de la exposición a etanol	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
EtOH - NP-Q-GSH	Nanopartículas de Quitósán- Glutación Reducido adicionadas después de la exposición a etanol	NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma oxidada
EROs	Especies reactivas de oxígeno	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida
RL	Radical libre	TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico



1 Objetivo General.

Evaluar la capacidad antioxidante de nanopartículas de Quitosán cargadas con glutatión reducido, utilizando cultivos organotípicos de hígado de rata expuestos a etanol, para comprobar el mejoramiento de la viabilidad celular a través de la utilización biomarcadores asociados con el estrés oxidativo.

1.1 Objetivos Particulares

- Elaborar Nanopartículas de Quitosán y de Quitosán con Glutatión reducido a través de la técnica de Gelación Ionotrópica, para mejorar la biodisponibilidad de dicho antioxidante.
- Caracterización de las Nanopartículas utilizando las técnicas de dispersión dinámica de la luz, y evaluación del porcentaje de encapsulación para determinar una estimación del tamaño promedio y posteriormente elaborar la concentración a utilizar en los cultivos organotípicos.
- Estimación de la concentración citotóxica de Etanol en cultivo organotípico de hígado de rata Wistar para seleccionar la concentración en la que la viabilidad celular se encuentre al redor del 70 % la cual será la utilizada para comprobar la capacidad antioxidante de nanopartículas de Quitosán cargadas con glutatión
- Comprobar la capacidad antioxidante de las Nanopartículas de Quitosán con Glutatión mediante la estimación de parámetros asociados al estrés oxidativo como, cuantificación de especies reactivas al ácido barbitúrico, cuantificación de proteínas, y prueba de la actividad de catalasa.

2 Hipótesis

El etanol es un agente xenobiótico cuya actividad está asociada a la inducción de estrés oxidativo en tejido hepático, entonces la citotoxicidad estimada en cultivos organotípicos hepáticos expuestos a etanol se modificará en la exposición con nanopartículas con glutatión

3 Justificación

Las enfermedades hepáticas como cirrosis, carcinoma hepático, hígado graso tienen un origen similar en las que la principal causa de estas patologías se asocia al consumo excesivo del etanol, ya que en la biotransformación de este compuesto se producen diversas especies reactivas de oxígeno, que causan un incremento en el estrés oxidativo. Considerando que el glutatión es el principal antioxidante en el hígado, y que cuando el desequilibrio óxido reducción es amplio, la cantidad de GSH no es suficiente para restaurar el estado redox óptimo y que el tripéptido solo es sintetizado de manera intracelular. En este trabajo consideramos que es importante el estudio de sistemas innovadores nanoestructurados de Quitosán con GSH que permitan mejorar la disponibilidad de este antioxidante, permitiendo su localización en la célula desencadenando, su poder antioxidante y podrá ser capaz de reducir la citotoxicidad de etanol.

4 Introducción

La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia a una escala menor de un micrómetro, es decir, a nivel de átomos y moléculas. Tiene múltiples aplicaciones, y cuando estos conocimientos y tecnología se aplican a la salud, surge la nanomedicina.

El objetivo de la nanomedicina se basa en el diagnóstico, terapia y prevención de enfermedades cuando se encuentran en etapas poco avanzadas, así como el desarrollo de una terapia más personalizada. Otra de las posibles aplicaciones es la nanoterapia para la liberación de fármacos. Esta terapia permitirá que al actuar de forma localizada, se podrán disminuir las dosis del fármaco además de tener un tratamiento más personalizado, por lo que los daños secundarios asociados al tratamiento serían menores. ⁽¹⁾

Impacto del alcohol en la salud

El abuso del alcohol es un problema importante de los países occidentales. El consumo excesivo de alcohol puede causar hígado graso, fibrosis y hepatitis. En muchos pacientes, el consumo continuo de alcohol causa cirrosis, lo que aumenta significativamente el riesgo de desarrollo de descompensación hepática, carcinoma hepatocelular y mortalidad ⁽²⁾

La vía más importante del metabolismo del etanol es por la enzima alcohol deshidrogenasa que en el hígado podría inducir la generación de especies reactivas del oxígeno (EROS) y generar un desequilibrio en el sistema oxido reducción del tejido del hígado. El estrés oxidativo resultante puede afectar a componentes celulares tales como lípidos, proteínas daño al ADN y a la membrana lipídica, debido al estrés oxidativo podría finalmente conducir a la muerte celular y daño tisular. El estrés oxidativo inducido por el alcohol en el tejido hepático podría promover la inflamación hepática. ^{(3) (4)}

Glutación

El glutatión es actualmente uno de los antioxidantes más estudiados. Esto es probablemente debido a que se sintetiza endógenamente en todo el cuerpo y se encuentra básicamente en todas las células, a veces en concentraciones bastante altas. Las investigaciones han destacado muchos papeles en los que se utiliza, incluyendo la defensa antioxidante, la desintoxicación de xenobióticos electrofílicos, la modulación de la transducción de señales reguladas redox, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación de la proliferación celular, la síntesis de desoxirribonucleótidos, leucotrieno y metabolismo de las prostaglandinas. ⁽⁵⁾

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de nanopartículas de Quitosan cargadas con glutatión reducido, sobre cultivos organotípicos de hígado de rata los cuales fueron expuestos en una concentración citotóxica de etanol, dichos cultivos fueron monitoreados a través de la viabilidad celular antes y después de la exposición de nanopartículas, para comprobar que estas, ingresan a la célula, libran el glutatión y este genera su efecto antioxidante.

5 Marco Teórico

6 Historia de la Nanotecnología y la Nanomedicina.

El ganador del premio Nobel de física de 1963, Richard Feynman, dio una conferencia, en 1959, en la que mencionó la posibilidad de almacenar los 24 tomos de la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler, de crear micromáquinas capaces de viajar a través del cuerpo humano, de manipular, átomo por átomo, la síntesis de materiales de nueva creación, y algunas otras ideas que en aquel tiempo eran difíciles de concebir ⁽⁶⁾

La Nanotecnología tiene sus fundamentos en ideas y conceptos lanzados a lo largo de la segunda mitad del siglo XX y que cristalizaron a finales en la década de 1980. El término "Nanotecnología" fue acuñado por el Profesor Norio Taniguchi en 1974 en una conferencia sobre Ingeniería de la Producción. Según su definición la Nanotecnología era la tecnología necesaria para poder fabricar objetos o dispositivos con una precisión del orden de 1 nm. En la década siguiente se fue fraguando una definición que afirmaba que la Nanotecnología era "la tecnología donde las dimensiones o tolerancias son en el rango de 0.1 a 100 nm" ⁽⁷⁾

Esta definición se ha seguido manteniendo por parte de la comunidad científica y se conoce como aproximación top-down (de arriba hacia abajo, de lo grande a lo pequeño). Un concepto alternativo irrumpió en 1986 cuando Eric Drexler propuso construir objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares. Esta aproximación se conoce como bottom-up (de abajo hacia arriba). En la actualidad se usa la terminología de Nanotecnología Molecular para describir esta aproximación ⁽⁸⁾

La nanomedicina se puede definir como la monitorización, reparación, construcción y control de los sistemas biológicos humanos utilizando nanodispositivos y nanoestructuras diseñadas a nivel molecular. Aunque esta definición todavía parece bastante amplia y abarcadora, está claro que esta definición se basa en el diseño, la síntesis y la evaluación de los nanomateriales en medicina. Los materiales nanoestructurados básicos, las enzimas de ingeniería y los muchos productos de la biotecnología serán enormemente útiles en aplicaciones médicas a corto plazo ⁽⁹⁾

Una parte de la nanomedicina es el desarrollo de nanomáquinas y nanorobots médicos controlados o programables. Tales máquinas microscópicas fueron hipotetizadas por primera vez por el físico ganador del Premio Nobel Richard Feynman en 1959, y más tarde fueron descritas detalladamente por K Eric Drexler en sus populares libros Motores de la creación (1986) y Unbounding the Future (1991), y en su más reciente nanosistemas de libro técnico: Molecular Machinery, Manufacturing y Computation (1992) ⁽¹⁰⁾

Si bien a menudo nos centramos en el futuro del campo de la nanomedicina, es igualmente importante considerar su pasado. A continuación hay una lista de fechas críticas en el campo de la nanotecnología, y el surgimiento de la nanomedicina a partir de la nanotecnología

- **1959** Richard Feynman ofrece una charla en la que se describe la construcción de máquinas moleculares con precisión atómica, que se cree que es la primera vez que se propone la nanotecnología como una iniciativa de investigación que podría revolucionar la ciencia.
- **1974** Norio Taniguchi (1974) utiliza el término "nanotecnología" en el trabajo sobre el mecanizado de ionización por chisporroteo.
- **1986** Se inventa el microscopio de fuerza atómica que posteriormente ha permitido un control sin precedentes sobre el diseño y la caracterización de nanomateriales.
- **1987** Primer simposio universitario "Explorando la nanotecnología" el 20 de enero en el Instituto Tecnológico de Massachusetts, Cambridge, MA, EE. UU.
- **1988** Primer curso universitario en la Universidad de Stanford, Palo Alto, CA, EE. UU. "Nanotecnología e ingeniería exploratoria".

- **1990** Se publica la primera revista de nanotecnología llamada Nanotecnología.
- **1996** Primera conferencia de nanobiotecnología realizada por International Business Communications "Enfoques biológicos y nuevas aplicaciones para la nanotecnología molecular" del 9 al 10 de diciembre de 1996, en San Diego, California, EE. UU.
- **1998** Primer estudio que demuestra un aumento del crecimiento tisular en nanoestructuras en comparación con los materiales actualmente utilizados
- **2000** El presidente de los EE. UU., Clinton, anuncia la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los EE. UU.
- **2003** Audiencias del Congreso sobre las implicaciones sociales de la nanotecnología.
- **2006** Como reflejo del interés mundial en la nanomedicina, se creó la primera revista internacional en nanomedicina: International Journal of Nanomedicine. ⁽¹⁰⁾.

Gracias a las herramientas proporcionadas por la nanotecnología, están surgiendo grandes avances en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, cardiovasculares. Probablemente una de las aplicaciones más extendidas en el campo de la terapia, se trata del uso de nanopartículas como vehículos transportadores para la liberación controlada de fármacos. La encapsulación de determinados fármacos en sistemas nanométricos ha demostrado en muchos casos mejorar la estabilidad, solubilidad y biodistribución del mismo. En algunos casos incluso se puede llegar a dirigir el fármaco hasta el órgano diana donde se quiere actuar de una manera más efectiva. De esta manera se consiguen medicamentos más efectivos y se va a requerir una menor dosis de fármaco, disminuyendo por tanto los posibles efectos secundarios y mejorando la calidad de vida del paciente. ⁽¹¹⁾

Con los avances tecnológicos de los últimos años, las nanopartículas han demostrado poseer un enorme potencial para su aplicación clínica. De esta manera surge una nueva disciplina denominada nanomedicina, que puede definirse como la rama de la medicina que aplica el conocimiento y las herramientas de la nanotecnología para tratar y prevenir enfermedades. ⁽¹²⁾

7 Definición de Nanopartículas

Las nanopartículas (NP) son definidas como dispersiones particuladas sólidas pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional ⁽¹³⁾

Las nanopartículas utilizadas en la administración de fármacos para terapia o para diagnóstico son sólidos coloidales que varían su tamaño de 2 nm a 1000 nm. Sin embargo, partículas mayores de 200 nm no son muy utilizadas debido a que pueden activar el sistema inmunológico y ser aclaradas en la sangre por las células Kupffer. Pero deben de ser suficientemente grande para evadir la filtración directa por los riñones (>5 nm). ⁽¹⁴⁾

Por lo tanto, las nanopartículas que oscilan entre los 10 y 100 nm poseen el tamaño más adecuado para alcanzar una distribución óptima en los sistemas in vivo. Además, la mayoría de las nanopartículas sintetizadas para transportar fármacos tienen una forma esférica ⁽¹⁵⁾

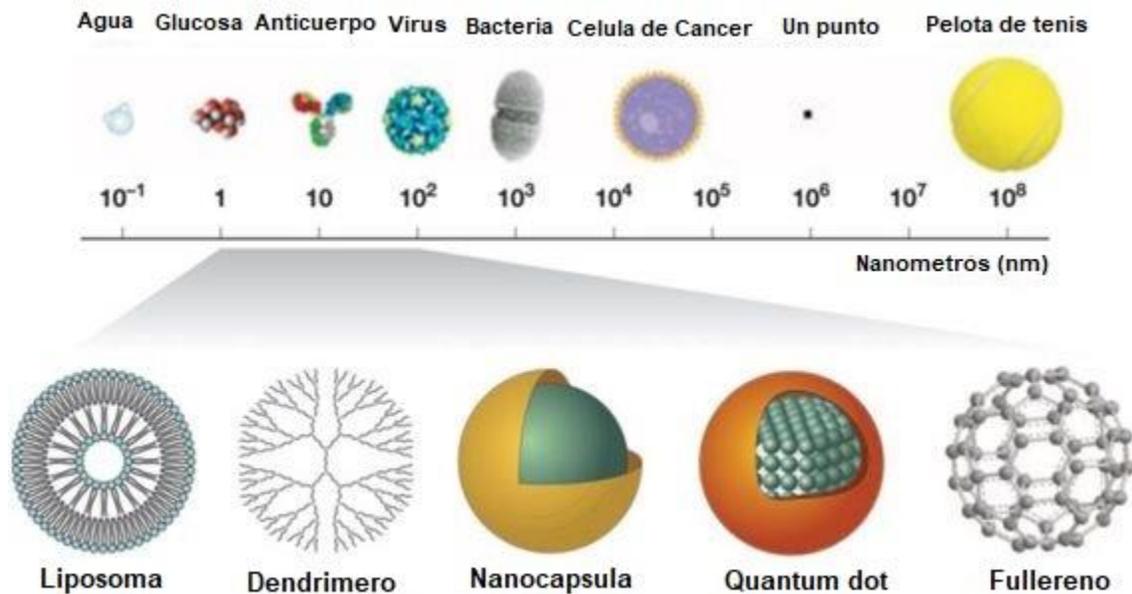


Figura 1 Escala Nanométrica que relaciona el tamaño de algunos tipos de nanopartículas y diferentes estructuras (<https://www.ecoportal.net/paises/internacionales/nanopartículas-un-veneno-que-no-se-ve/>)

8 Ventajas del uso de nanopartículas

Las ventajas de usar nanopartículas como sistema de entrega de diferentes fármacos son las siguientes:

1. Tamaño de partícula y características superficiales de las nanopartículas pueden manipularse fácilmente para lograr tanto la localización pasiva como activa del fármaco después de una administración parenteral.
2. Controlan y mantienen la liberación del fármaco durante el transporte y en el sitio de localización, alterando la distribución del fármaco y en consecuencia la eliminación posterior del mismo por lo que se logra un aumento en la eficacia terapéutica del fármaco y reducción de los efectos secundarios.
3. La liberación controlada y las características de degradación de las partículas, pueden ser fácilmente moduladas por la selección de los constituyentes de la matriz. La carga del fármaco es relativamente alta por lo que pueden ser incorporados en los sistemas nanoparticulados sin ninguna reacción química; este es un factor importante para preservar la actividad del Fármaco.
4. La orientación específica del sitio de acción, se puede lograr mediante la unión de ligandos dirigidos a la superficie de las partículas.
5. Los sistemas se puede usar para varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular. ⁽¹⁶⁾

9 Tipos de nanoestructuras

Las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo que se traduce en comportamientos diferentes en cuanto a la conductividad eléctrica, conductividad térmica, resistencia, elasticidad y biocompatibilidad con respecto a las escalas convencionales conocidas

9.1 Nanopartículas

Son partículas con un diámetro entre 1 y 1.000 nm, que pueden ser nanoesferas o nanocápsulas. Están compuestas por polímeros biodegradables y tienen la capacidad de llevar fármacos o diferentes elementos en su interior, repartirlos y acumularlos en sitios blanco; además, tienen una penetración directa en redes capilares gracias a su pequeño tamaño ⁽¹⁷⁾

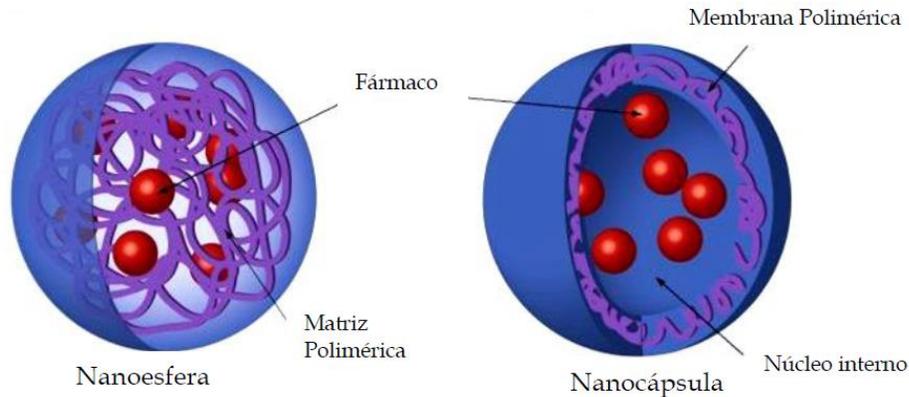


Figura 2 Principales nanopartículas poliméricas: Nanoesferas y nanocápsulas ⁽¹⁸⁾

9.2 Micelas poliméricas

Son partículas formadas por uniones de polímeros "anfifílico". Las micelas tienen la capacidad de encapsular moléculas como lípidos, antimicrobianos, antioxidantes y vitaminas, los cuales no son solubles o son pocos solubles en agua y con ayuda de las micelas logran serlo; además, permiten minimizar su eliminación por el sistema retículoendotelial. Pueden ser usadas potencialmente en el tratamiento de tumores, pues su rica irrigación facilita que estas partículas liposolubles traspasen las membranas celulares con mayor facilidad y en mayor cantidad hacia dichos blancos terapéuticos ⁽¹⁹⁾

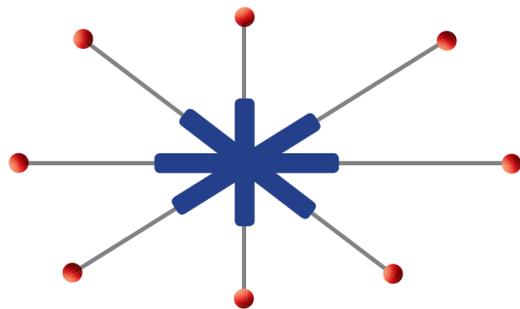


Figura 3 Micela polimérica ⁽²⁰⁾.

9.3 Liposomas

Son vesículas artificiales, individuales o multilaminares (a base de lecitinas u otros lípidos) en escala nanométrica formadas por hidratación de fosfolípidos que, al igual que las micelas, pueden incorporar en su interior diferentes componentes, aun en mayores cantidades. La composición de las membranas puede ser muy diversa, lo cual es una ventaja a la hora de encapsular moléculas hidrofílicas o hidrofóbicas. Se utilizan para la entrega de moléculas o complejos biológicos moleculares, como en la administración de fármacos y la transferencia de genes. Los liposomas también se han utilizado para estudiar las membranas y sus proteínas. ⁽²¹⁾

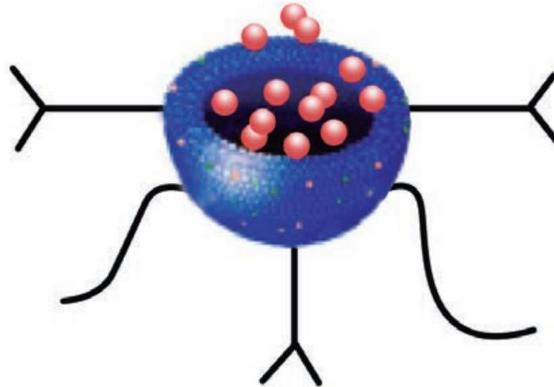


Figura 4 Micela polimérica ⁽²⁰⁾.

Una ventaja adicional, valorada últimamente, es la adición de ligandos a la superficie de la micela, lo que genera especificidad hacia los diferentes blancos. Una preparación que se ha desarrollado recientemente es la unión de fármacos insolubles en agua, localizándolo en el centro hidrófobo, y la colocación de ligandos en el manto hidrofílico, lo que ha mejorado la captación del medicamento por el blanco terapéutico, disminuyendo la necesidad de este para un mismo efecto deseado. ⁽²²⁾

9.4 Quantum dots

Son cristales fluorescentes que pertenecen a la escala nanométrica y producen luz cuando son excitados. Esta característica los hace muy útiles cumpliendo la función de marcador biológico ⁽²³⁾

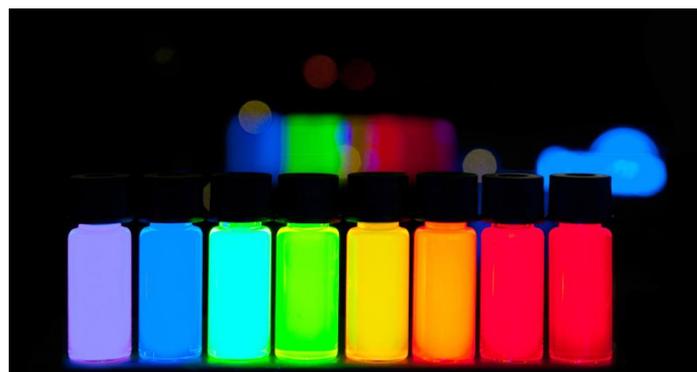


Figura 5 Quantum dots ⁽²⁴⁾.

9.5 Dendrimeros

Son estructuras poliméricas, pero a diferencia de las micelas, sus unidades de transporte no se encuentran en el centro, sino que están conformados por un sistema de ramificaciones perfectas, el cual utiliza para el transporte de diferentes componentes; estas ramificaciones le permiten tener una mayor capacidad de carga. Gracias a ello, además de ser utilizado en el campo de la oncología, se ha potenciado también como elemento de transporte de medio de contraste y otros elementos radioterapéuticos. ⁽²⁰⁾

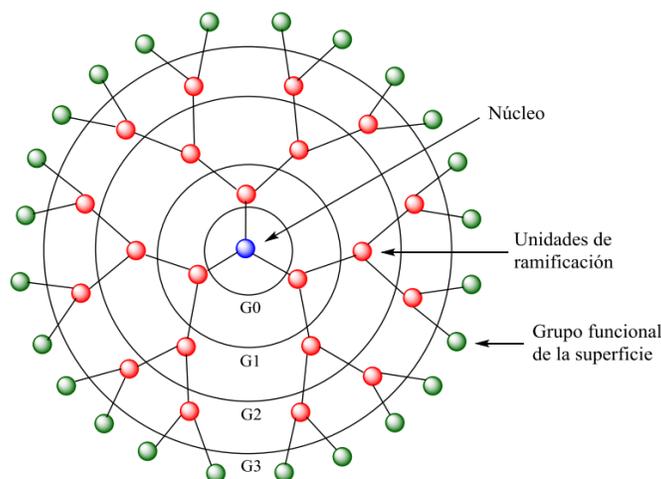


Figura 6 Estructura general de un dendrimer ⁽²⁵⁾.

9.6 Nanotubos de carbono

Son estructuras tubulares compuestas por átomos de carbono de diámetro nanométrico que se componen también de varias láminas de diferentes materiales enrolladas sobre sí mismas. A su vez, los nanotubos pueden ser monocapa (un solo tubo) o multicapas (varios tubos), uno dentro de otro. Esta configuración le da a la estructura mayor dureza y flexibilidad, a comparación de los materiales conocidos actualmente, tanto así que puede tener mayor dureza y resistencia que un diamante, a pesar de tener la misma composición química. Los nanotubos pueden utilizarse como nanopinzas o nanoestructuras.

- **Nanopinzas:** la unión de dos nanotubos que se someten a cambios de voltaje genera una modificación estructural que, según su disposición, crea movimientos de apertura o cierre, dando opción de modificar partículas a nanoescala con estas pinzas.
- **Nanoestructuras:** dada las características físicas generadas por los nanotubos, se ha logrado el desarrollo de materiales como mallas y materiales quirúrgicos de alta resistencia y durabilidad, bajo la manipulación y unión de los nanotubos. ⁽²⁶⁾

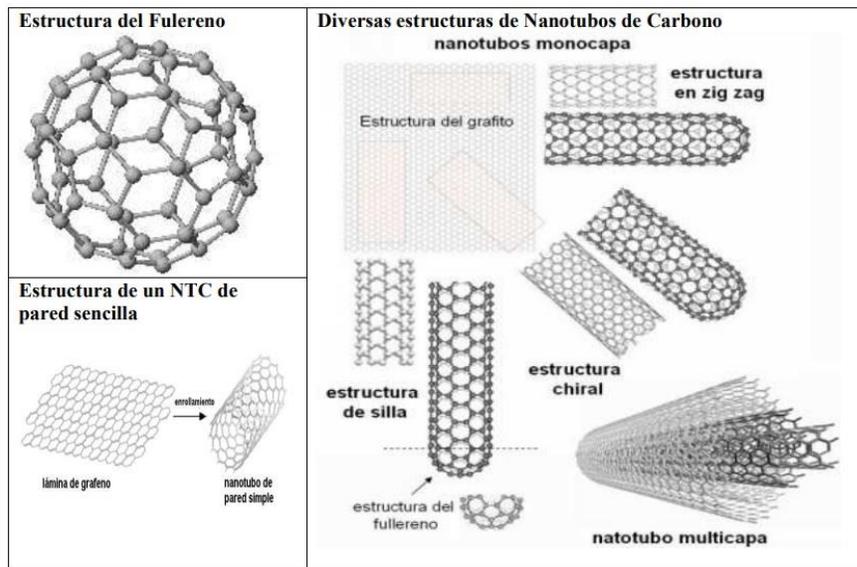


Figura 7 Diversas estructuras de Carbono ⁽²⁷⁾.

10 Métodos de preparación de nanopartículas

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías, las aproximaciones *de arriba hacia abajo* (*Top-Down*) y las *de abajo hacia arriba* (*bottom-up*). La primera consiste en la división de sólidos máscicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. La segunda aproximación, de abajo hacia arriba, consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas. El soporte da estabilidad a las nanopartículas, además de que les puede conferir propiedades específicas

La aproximación de arriba hacia abajo, requieren de instrumentación compleja y complicada, lo cual los hace costosos, por tanto, muchas veces se prefieren los métodos que utilizan la aproximación de abajo hacia arriba. Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de abajo hacia arriba para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas. ⁽²⁹⁾

10.1 Nanoemulsiones con el método de alta energía.

En la producción de emulsiones muy finas formadas por procesos "top-down" (reducción del tamaño mediante procesos mecánicos), se requieren altas densidades energéticas, aplicándose fuerzas externas a las mezclas agua- aceite -tensoactivo para deformar, romper grandes gotas para reducirlas de tamaño. Específicamente, en los métodos "top-down", el tamaño y la polidispersidad de las gotas de las nanoemulsiones dependen de la energía aplicada durante el proceso de emulsificación, del tiempo durante el cual se aplica la energía, y de los componentes que la forman, especialmente de la relación surfactante/fase dispersa. Entre los equipos de dispersión más eficaces para producir nanoemulsiones están los homogeneizadores de alta presión, molinos coloidales y los generadores de ultrasonido. La energía que suministran estos equipos produce suficiente cizalla para romper las gotas de la emulsión en otras más pequeñas. Dentro de las características esperadas se encueran: una alta eficiencia de encapsulación, turbidez baja, alta biodisponibilidad y una alta estabilidad física. ⁽²⁸⁾

En el caso de ultrasonido, este proceso ha ganado interés y popularidad entre los diferentes sectores industriales debido a su eficiencia energética, bajo costo de producción, y por ser un sistema de manejo de control de variables relativamente fácil. Algunos ejemplos son la elaboración de nanoemulsiones dirigidas a encapsular componentes bioactivos, nutracéuticos, aditivos, sabores, compuestos vitamínicos, productos de interés farmacéuticos.

La emulsificación por ultrasonido involucra la producción de ondas acústicas (frecuencias mayores de 20 kHz) que se propagan a través del líquido alternando ciclos de alta presión y baja presión (cavitación) seguidos de la disrupción de las gotas bajo por el efecto de cavitación desarrollado en el medio líquido. ⁽²⁹⁾

10.2 Emulsificación por evaporización del disolvente.

Se prepara una solución del polímero y del compuesto activo en un solvente orgánico volátil inmiscible o parcialmente miscible en agua, como el diclorometano o el acetato de etilo. Posteriormente, la fase orgánica es emulsificada en agua mediante una agitación intensa, que se puede realizar por medio de un homogeneizador, por microfluidización o por ultrasonido; en algunas ocasiones se emplea la presencia de un tensoactivo para estabilizar la emulsión. Finalmente, el solvente orgánico se evapora (algunas veces a presiones reducidas, de acuerdo a la estabilidad del principio activo que se esté atrapando), lo que causa que el polímero insoluble en agua, precipite, formando nanopartículas con el compuesto activo incluido. Estas se recuperan por centrifugación o filtración y se resuspenden en agua para una posterior liofilización con el objetivo de almacenarlas. En esta metodología la cantidad de compuesto activo que se puede atrapar se ve limitada tanto por la cantidad que se puede solubilizar en el solvente a emplear, como por la afinidad del compuesto activo por el agua, ya que los compuestos que son altamente hidrófilos pueden migrar hacia el agua, disminuyendo la cantidad que se atrapa dentro de las nanopartículas. ⁽³⁰⁾

10.3 Síntesis de Nanopartículas por Salting-Out

No utiliza disolventes clorados. 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. ⁽³¹⁾

10.4 Síntesis de Nanopartículas por polimerización interfacial

Utiliza las ventajas de ciertos polímeros con rápida velocidad de polimerización. Utilizando ciertos monómeros que se disuelven junto con el fármaco en eter de petróleo y etanol absoluto, se forma una mezcla que luego lentamente es extruida a través de una aguja sobre una solución acuosa del surfactante. En este caso las nanopartículas se forman espontáneamente por polimerización del monómero después de iniciar el contacto con los iones presentes en el agua. La suspensión coloidal resultante puede concentrarse por evaporación a presión reducida. Algunos de los polímeros utilizados en la obtención de NP por este método son, poli (isobutilcianoacrilato) (PECA), y poli (isohexilcianoacrilato). El polímero utilizado para formular las nanopartículas también afecta de manera importante a la estructura, propiedades y aplicaciones de las partículas. Es así que no existe un polímero único para todos los fármacos. Para cada fármaco, hay que evaluar las propiedades del sistema (del fármaco y de las partículas formadas), y determinar si es o no la formulación óptima para una determinada vía de administración. La concentración y peso molecular del polímero a utilizar también afectarán a la formación de nanopartículas. El peso molecular del polímero tiene efecto inverso sobre de tamaño y la eficiencia de encapsulación. Nanopartículas, de aproximadamente 100 nm, se pueden preparar

con polímeros de bajo peso molecular, sin embargo, a expensas de la reducción de la eficiencia de encapsulación del fármaco. Un aumento de la concentración de polímeros aumenta la eficiencia de encapsulación pero también el tamaño de las nanopartículas. ⁽³¹⁾

10.5 Gelación Ionotrópica.

Las nanopartículas se forman de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida. Entre las ventajas de este sistema cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza policationica del quitosano le confieren a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación.

El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de quitosano-Tripolifosfato (TPP) plantea que la gelificación ionotrópica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH_3^+$ del quitosano. El tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica. A su vez, el efecto de otras condiciones preparativas y de las características intrínsecas del quitosano ha sido estudiado, con atención a la composición; peso molecular y grado de acetilación del quitosano. En general, el tamaño de partícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm; el potencial zeta entre +20 y +50 mV e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica. Dichas características, confieren a las nanopartículas de quitosano propiedades óptimas para la interacción con diversos epitelios. ⁽³²⁾

10.6 Método de doble o múltiple emulsión

Este método ha hecho posible encapsular compuestos hidrófilos. En primer lugar, un fármaco hidrófilo y un surfactante se disuelven en agua. La emulsión primaria es preparada por la dispersión de la fase acuosa en un disolvente orgánico que contiene un polímero disuelto. Se trata entonces de una reemulsificación con una nueva fase acuosa que contiene también surfactante. Luego, el procedimiento de eliminación de disolvente y recolección de las nanopartículas es similar a la técnica de emulsión simple. ⁽³¹⁾

11 Caracterización de nanopartículas

Para caracterizar los nanomateriales se han empleado diversas técnicas experimentales que proporcionan información complementaria. La nanometrología es la ciencia de las mediciones realizadas en la escala de 10^{-9} unidades de medición. Tradicionalmente esta disciplina ha sido enfocada como tecnología de manufactura de precisión, sin embargo actualmente su papel ha cambiado a un rol clave en el desarrollo de tecnologías emergentes aplicadas en campos de suma importancia que incluyen: medicina, electrónica, energía, espacio, militar y otras. En paralelo, las necesidades de medición en esta escala han mostrado que el desarrollo de nuevas técnicas de medición con un enfoque científico interdisciplinario es clave para caracterizar las propiedades de los sistemas en esta escala. Por lo tanto, el reto que presenta la nanotecnología para asegurar su potencial económico es el desarrollo de medios seguros y cuantizables que soporten la necesidad de medición que esta nueva revolución industrial requiere ⁽³³⁾

11.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución in vivo, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, además de influencias en la carga de fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas. ⁽¹⁶⁾

11.2 Dispersión de luz dinámica.

Es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica, y con la última tecnología, inferiores a 1 nm. Las aplicaciones típicas de la dispersión de luz dinámica son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein ⁽³⁴⁾

A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas la dispersión de luz dinámica no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. Al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, la luz láser se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada.

Como consecuencia del movimiento Browniano, en donde las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. ⁽³⁵⁾

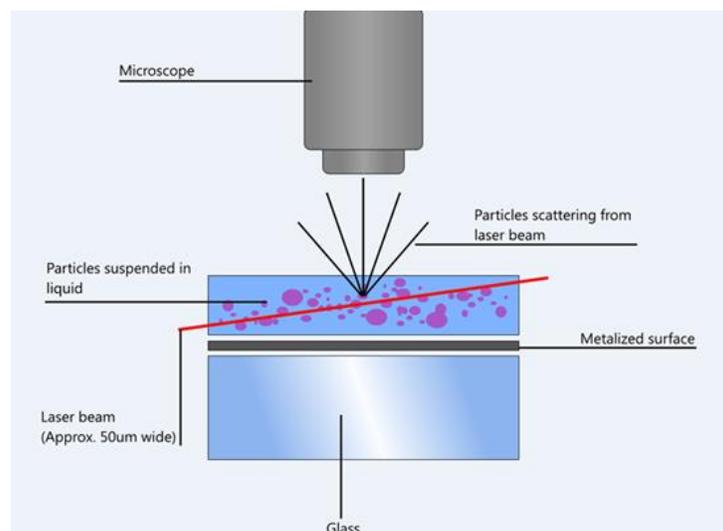


Figura 8 Dispersión de la luz ⁽³⁴⁾.

11.3 Microscopia

En la escala de nanómetros, técnicas de microscopía tradicional no pueden resolver las partículas que necesitamos observar. Por lo que acudimos a métodos más poderosos como microscopía electrónica de barrido (SEM, scanning electron microscopy en inglés, o MEB) o microscopía electrónico de transmisión (TEM, transmission electron microscopy en inglés, o MET) para ver con claridad el mundo de nanopartículas.

11.4 Microscopia electrónica de barrido

El rayo de electrones con energía alta se produce proyectando electrones de un filamento, por el uso de calor o un campo eléctrico, y luego acelerando los electrones a una alta energía. Cuando el rayo de electrones hace contacto con la muestra, un numero alto de electrones secundarios de energía baja son expulsados de la superficie de la muestra, y son acelerados a un detector. El rayo mueve lentamente adelante y atrás en la muestra para barrer el área de la muestra. (Este movimiento es lo que da la técnica su nombre.) Durante el proceso de barrido, un detector mide la cantidad de electrones que cada región de la muestra emite, y usa esas mediciones para construir una imagen. Regiones con rasgos más próximos al detector tienen más electrones secundarios expulsados que van al detector, que corresponde a un área de colores más claros en la imagen construida. En cambio, las regiones que tienen valles son más lejas del detector, y aparecerán más oscuras porque menos electrones secundarios llegan al detector de esas áreas.

11.5 Microscopia electrónica de Transmisión

El detector en TEM se localiza debajo de la muestra en vez de encima de la muestra. Eso requiere que el rayo de electrones pasa a través de (o transmite a través de) una muestra muy delgada. Cuando el rayo de electrones pasa por la muestra, unos electrones hacen contacto con átomos o electrones dentro del material y dispersan lejos del detector. El resto del rayo de electrones hace contacto con el detector, haciendo algo que es esencialmente una imagen de la sombra de la muestra. La ventaja por esta técnica en comparación a SEM es la potencia por una resolución mucho más alta. ⁽³⁶⁾

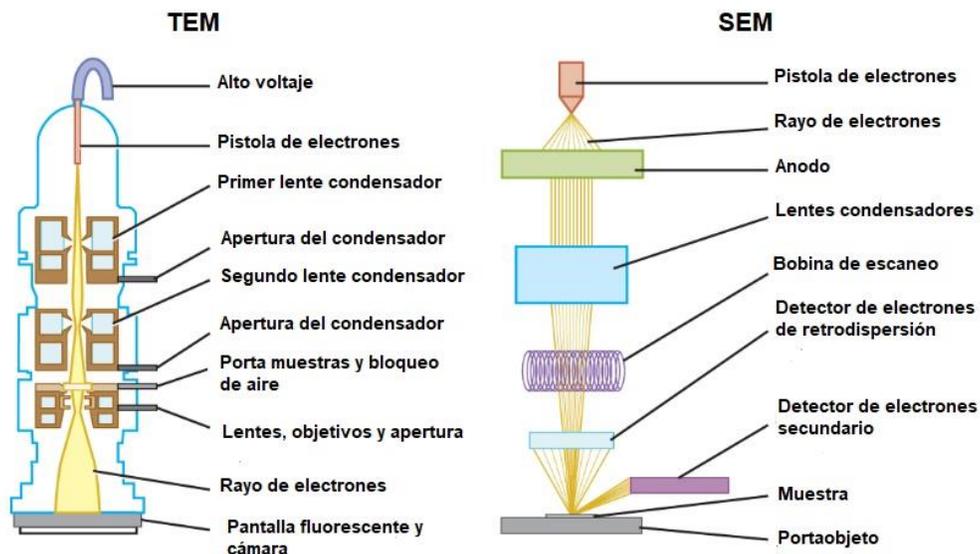


Figura 9 Diferencias entre Microscopia electrónica de Transmisión y Microscopia electrónica de barrido. <https://philschatz.com/microbiology-book/contents/m58787.html>

11.6 Potencial Z.

El potencial zeta es una propiedad de los materiales que miden el potencial electrocinético en sistemas coloidales. Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern. El potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unido a la partícula dispersada. Este valor puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial, no pueden medirse en los fluidos. ⁽³⁷⁾

La importancia del potencial zeta es: que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión. Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeños, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación. Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, y se forman flóculos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial zeta se estabilizan eléctricamente, mientras que, los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular o flocular. También la estabilidad de las dispersiones depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y las fuerzas de atracción de van der Waals ⁽³⁸⁾

11.6.1 Modelo de la doble capa

Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un coloide negativo. Los contraiones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que juntos se llaman la doble capa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución. ⁽³⁹⁾

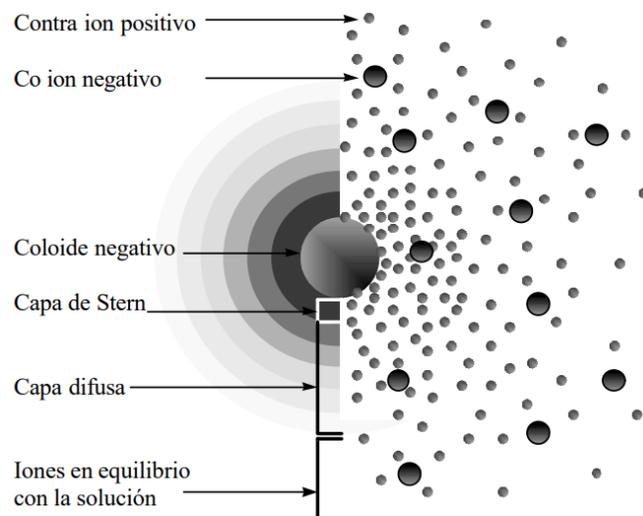


Figura 10 Modelo de la doble capa ⁽³⁹⁾.

12 Nanotoxicología

La nanotoxicología es una disciplina emergente que se puede definir como ciencia de ingeniería nanodispositivos y nanoestructuras que se ocupan de sus efectos en organismos vivos. Estudios recientes muestran la habilidad de los nanomateriales para pasar a través de las barreras biológicas, alcanzar el torrente sanguíneo y transportarse hacia órganos primarios y secundarios. Dependiendo de las rutas de exposición (inhalación, ingestión o dérmica), los nanomateriales muestran diversos patrones de biodistribución, provocando diversos efectos como fibrosis, daños en el ADN y cáncer. La nanotoxicología actual se centra en estudios in vitro, estudios de

toxicodinámica y estudios in vivo. La nanotoxicología actual se basa en el paradigma de exposición dosis respuesta de las NP, según el cual, la exposición a NP con diversas características fisicoquímicas mediante la inhalación, ingestión o a través de la piel puede derivar en su distribución a otros sistemas del organismo distintos del de entrada. ⁽⁴⁰⁾



Figura 11 Representación del estudio de la nanotoxicología. ⁽⁴⁰⁾.

13 Biomarcadores de exposición.

Un marcador de exposición puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina). En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de 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 (p. ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (p.ej. tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas). ⁽⁴¹⁾

14 Biomarcadores de Efecto

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.).

15 Biomarcadores de susceptibilidad

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas. Podemos distinguir dos tipos: marcadores de polimorfismos de sistemas activadores, y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores permiten la medida de actividad de los enzimas del citocromo P-450. Los marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores son medidas de actividad de enzimas tales como la glutatión-S-transferasa, la acetiltransferasa, la sulfotransferasa, la glucuroniltransferasa o la paraoxonasa. ⁽⁴²⁾

16 Citotoxicidad

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han descrito pruebas in vitro para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales, cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas.

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada "toxicología reguladora", rama dentro de la toxicología que se dedica a la legalización y armonización de todos los protocolos e informes de sustancias tóxicas a partir de normativas legales, disposiciones ministeriales por propia iniciativa o como cumplimiento de recomendaciones o directrices de organismos internacionales los cuales producen un extenso cuerpo legal de raíz toxicológica, ampliamente conocidas. Como justificación de la toxicología alternativa, se suele dar el alto costo de los estudios in vitro y la presión de las sociedades de protección de los animales de experimentación. Dentro de la batería de ensayos in vitro como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. ⁽⁴³⁾

17 Estrés Oxidativo

El oxígeno es un elemento que presenta un perfil con doble efecto fisiológico; es esencial para el desarrollo de la vida aerobia y posee efectos tóxicos inherentes a su estructura. Del oxígeno se derivan moléculas inestables denominadas radicales libres que pueden causar daño a nivel celular, cuando se pierde el equilibrio entre dichas moléculas y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos, generando así lo que se denomina estrés oxidativo. Dicho mecanismo posee una estrecha relación con el desarrollo y evolución de una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Su estudio se ha centrado principalmente en el conocimiento de los mecanismos de su génesis y las formas de; atenuar, disminuir o contrarrestarlas, por medio de los sistemas de defensa antioxidante que posee la célula y la forma de controlar los radicales libres que se generan de forma normal en el organismo resultado de algunos procesos celulares como el relacionado con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, proceso necesario para la obtención de ATP. ⁽⁴⁴⁾

17.1 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres se definen como átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado el cual les confiere inestabilidad éstos se forman normalmente durante el metabolismo celular, Gerschman habló por primera vez sobre la teoría de la toxicidad del oxígeno en 1945 en la cual proponía que la toxicidad del oxígeno se debía a formas de oxígeno reducidas parcialmente.

Luego, Denham Harman propuso que los radicales libres jugaban un papel importante en el envejecimiento. En 1969, McCord y Fridovich descubrieron la enzima superóxido dismutasa (SOD) y dieron evidencia suficiente sobre la importancia de los radicales libres. En 1977, Mittal y Murad mostraron evidencia de que el radical hidroxilo (-OH) activaba la formación de segundos mensajeros importantes para la célula, proponiendo la existencia de una coevolución entre la producción de radicales libres y los procesos celulares. Se mostró que a bajas concentraciones, los radicales puede tener efectos benéficos en la célula jugando un papel importante en la

respuesta a agentes infecciosos, vías de señalización celular, la senescencia y la apoptosis celular y la inducción a la respuesta mitogénica, además de una sobre producción de estos radicales libres o especies reactivas de oxígeno (EROs) que producen estrés oxidativo, un proceso deletéreo el cual puede producir cambios en la estructura celular (lípidos y membranas), proteínas y ADN y puede inducir y mantener la oncogénesis de células cancerosas. ⁽⁴⁵⁾

Aunque la vida media de los radicales libres es realmente corta, desde milisegundos a nanosegundos, en cada reacción de oxidación con otro átomo o molécula, un radical libre puede generar nuevas formas con diferente nivel de estabilidad y toxicidad.

En los organismos de metabolismo aeróbico las especies reactivas de mayor importancia, son aquellas que se forman durante el metabolismo del oxígeno, y se denomina EROs. Es importante considerar que el término EROs incluye una variedad de radicales libres propiamente dichos y otros átomos o moléculas que no son radicales libres, pero que se consideran EROs por su alta reactividad en el medio que les confiere la capacidad de generar EROs, como es el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, existen otras familias derivadas del nitrógeno (especies reactivas del nitrógeno [RNS]), del azufre (especies reactivas del azufre) que pueden o ser originadas por la interacción del átomo o molécula con algunas EROs o incrementar la producción de estas últimas ⁽⁴⁶⁾

Tabla 1 Clasificación y abreviatura de los radicales libres ⁽⁴⁶⁾.

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas de Oxígeno	Oxígeno singulete	O_2
	Ion superóxido	O_2^{*-}
	Radical hidroxilo	OH^*
	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
	Radicales alcoxi y peroxi	RO^* y ROO^*
	Radical hidroperoxilo	$ROOH^*$
Especies reactivas del nitrógeno	Óxido nítrico	NO^*
	Dióxido nítrico	NO_2^*
	Peroxinitrito	$ONOO^{*-}$
Especies reactivas del azufre	Radical tiilo	RS^*

Específicamente las EROs son radicales libres derivados del oxígeno, el oxígeno molecular o dióxígeno es considerado ERO primario, este interactúa con otras moléculas y genera EROs secundarios como el peróxido de hidrógeno el cual se produce en su mayoría en la mitocondria en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones y produce iones libres de hierro, este hierro libre puede participar en 10 reacciones tipo Fenton y Haber Weiss produciendo radicales hidroxilo ($\cdot OH$) altamente reactivos. También existen otros radicales derivados del oxígeno como lo son los radicales peroxilo ($ROO\cdot$) como por ejemplo el hidroperoxil ($HOO\cdot$) el cual inicia la peroxidación de ácidos grasos. El consumo de oxígeno en los peroxisomas produce peróxido de hidrogeno H_2O_2 el cual es usado para oxidar algunas enzimas este es contrarrestado por la catalasa para evitar toxicidad por acumulación de H_2O_2 si se daña éste mecanismo el H_2O_2 va al citosol y causa estrés oxidativo. Las RNS son especies reactivas derivadas del nitrógeno, el $NO\cdot$ es una molécula que contiene un electrón desapareado y se produce en tejidos biológicos por acción de la Óxido nítrico sintasa (NOSs) para metabolizar arginina y citrulina. El $NO\cdot$ es importante en diversos procesos fisiológicos incluyendo neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación muscular y regulación inmune ⁽⁴⁵⁾

17.1.1 Formación de Radicales libres

Los radicales libres se pueden formar a partir de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común. Una vez que estos son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox). En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes. Dicho mecanismo genera que la producción de radicales libres sea una reacción en cadena, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical inevitablemente esta última pasa a ser un radical libre. Dicha reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí. Estas reacciones bioquímicas se encuentran clasificadas en tres grupos:

- Reacciones de iniciación: Es la formación de un radical libre a partir de no radicales.
$$AB + C \rightarrow A\bullet + D + E$$
- Reacciones de propagación: Consisten en la formación de un radical libre cuando reacciona una molécula estable con un radical libre
$$A\bullet + CD \rightarrow AC + D\bullet$$
- Reacciones de terminación. Hace referencia a la reacción química entre dos radicales libres, en donde sus electrones desapareados son cancelados y se genera un producto estable.
$$A\bullet + D\bullet \rightarrow AD$$

(47)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2-5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno (RLO), que no son más que átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, y que también se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace. Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón. Últimamente prefiere llamársele EROs, para agrupar a algunos compuestos que como el peróxido de hidrógeno, no constituyen un verdadero radical.

Estas EROs son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales y se forman de la siguiente manera: La reducción univalente del O_2 produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente, genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un RLO, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH) que es varios miles de veces más reactivo que el $O_2^{\bullet -}$ y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres. (48)

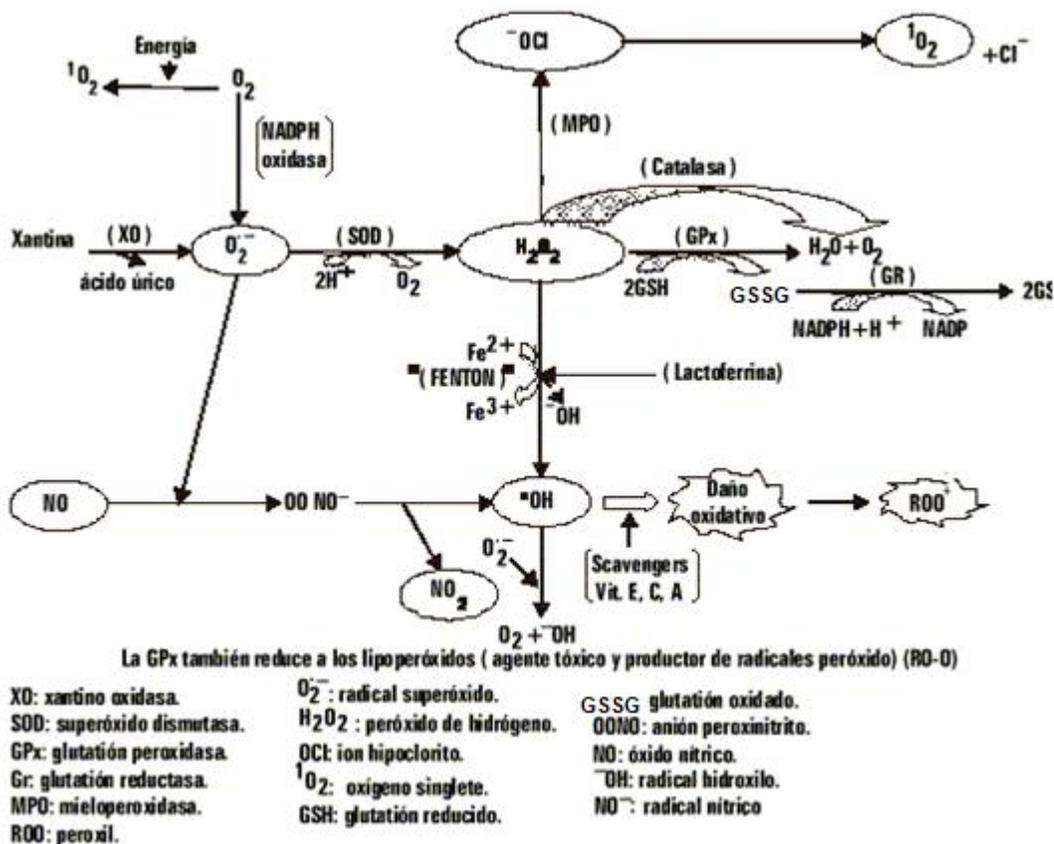


Figura 12 Representación metabólica de las especies reactivas del oxígeno. (Imagen con modificación) ⁽⁴⁸⁾

17.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica, importante en inflamación y funciones mitocondriales, es un proceso complejo que consiste en tres estados: iniciación, propagación y terminación. Para cada estado hay métodos disponibles que permiten cuantificar el avance del proceso y, de esta manera, evidenciar su existencia. Por ejemplo, debido a que la peroxidación lipídica causa pérdida de sustancias, como cadenas de ácidos grasos insaturados, la medición del contenido de lípidos puede indicar peroxidación de estos compuestos. Además, debido a que el oxígeno es consumido durante el estado de propagación, las mediciones de su captación por electrodos de oxígeno puede servir como una herramienta para evaluar el progreso de la oxidación. ⁽⁴⁹⁾

Otro enfoque consiste en la medición de la formación de peróxido durante el proceso. Entre los muchos métodos desarrollados para ese propósito, algunos determinan la concentración de peróxido total, mientras que otros determinan la concentración de peróxido, lo que puede indicar que el ácido graso sufre el proceso del peroxidación. Mediante la sustracción de un hidrógeno por una especie reactiva de oxígeno y nitrógeno ocurre una reestructuración del ácido graso, dando lugar a un radical libre que se caracteriza por la formación de un dieno conjugado, el cual se puede monitorear fácilmente por métodos espectroscópicos ⁽⁵⁰⁾

17.3 Métodos de evaluación del estrés oxidativo

Un gran problema dentro del estudio de los radicales libres y del estrés oxidativo han sido las mediciones in vivo de los radicales libre, debido a que estos poseen una vida media bastante corta. Sin embargo, la única técnica que permite la medición de RL de forma directa es el electron spin resonance (ESR). Por esto, se han implementado otras técnicas que permiten ver el daño causado por los RL y la actividad de ciertos parámetros dentro del estrés oxidativo como son;

cuantificación de proteínas totales, (técnica de Lowry y método de Bradford), quimioluminiscencia, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), actividad de SOD, determinación de catalasa, determinación de la enzima Glutacion peroxidasa, medición de Glutacion S- Transferasa, medición de glutatión y determinación de nitritos y nitratos y cuantificación de isoprostanos. ⁽⁵¹⁾

Tabla 2 Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección Especies Reactivas de oxígeno y Nitrógeno ⁽⁵⁷⁾.

Tipo de medición		Marcadores		Pruebas y métodos de detección	
Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	Medición directa	ERO	---	<ul style="list-style-type: none"> • Electrón spin resonante - Espectroscopia • Fluorescencia - Citometria de flujo-espectrofluorometria 	
		ERN	---	Método del ion electrodo	
	Medición indirecta	Lípido	a) Malonildialdehido (MDA)		Colorimétrico, fluorométrico, ELISA, HPLC
			b) Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)		Colorimétrico, fluorométrico
			c) 4-Hidroxinonenal (HNE)		GC-MS, HPLC
			d) F2 isoprostanos (8-iso-PGF2)		Colorimétrico, fluorométrico, ELISA
			e) Hidroperoxidación lipídica - Hexanoil-Lys aducto (HEL)		ELISA, HPLC
			f) Lipoproteína de baja densidad oxidada		HPLC, ELISA
		Proteína	a) Carbonilo		Colorimétrico, ELISA
			b) 3-Nitrotirosina		GC-MS, HPLC, ELISA
			c) Tiolproteína		Colorimétrico, ELISA
		ADN	a) 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)		HPLC, LC, MC, ELISA
			b) Ruptura del ADN		Ensayo Cometa, citometría de flujo

Tabla 3 Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección Especies Antioxidantes ⁽⁵⁷⁾.

Tipo de medición		Marcadores	Pruebas y métodos de detección
Antioxidante	Actividad de enzimas antioxidantes	Superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, glutatión reductasa, xantina oxidasa	Colorimétrico, ELISA
	Antioxidantes no enzimáticos	Glutatión	Colorimétrico, fluorométrico, HPLC
		Ácido ascórbico, α tocoferol, β caroteno, licopeno	Colorimétrico
		Zn, Se, Mn, Cu, Fe	Fotometría de llama
Capacidad antioxidante	a) Total Antioxidant Status (TAS)		Colorimétrico
	b) Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)		Colorimétrico
	c) Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)		Colorimétrico
	d) Asymmetric Dimethylarginine (ADMA)		Colorimétrico

Tabla 4 Principales métodos usados para identificar a una célula muerta y diferenciarla de una célula moribunda ⁽⁵⁸⁾.

Características de la célula que se desea determinar		Método a emplear
Identificación de una célula muerta	La pérdida de la integridad de la membrana plasmática	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas de microscopía: Marcaje con Azul de tripán • Técnicas espectrofotométricas: Ensayo de LDH • Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con Yoduro de propidio
	La fragmentación de la célula (incluido su núcleo)	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas de microscopía: Visualización en microscopio óptico, Marcaje fluorescente Hoechst
	La fagocitosis de la célula	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas de microscopía: Visualización en microscopio óptico • Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje de célula fagocítica y de célula fagocitada
Identificación de una célula con viabilidad comprometida	La activación masiva de proteasas «de muerte» (Ej. caspasas)	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas espectrofotométricas: Análisis de actividad enzimática • Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Detección de caspasa activa, Análisis de actividad enzimática
	Pérdida del potencial membranar mitocondrial (o actividad mitocondrial)	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas espectrofotométricas: Reducción de sales de tetrazolio • Citometría de flujo: Marcaje con TMRE
	Permeabilización de la membrana mitocondrial	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con TMRE, Marcaje de proteínas del espacio intermembranar de las mitocondrias
	Exposición extracelular de fosfatidilserina	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con Anexina-V

17.3.1 Evaluación de proteínas método de Bradford

Es un método para medir algunas de las EROs, pero indirectamente, mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre las proteínas. Los grupos carbonilo de las proteínas se generan por oxidación de varias cadenas de aminoácidos, por la formación de aductos de la reacción de Michael entre residuos de lisina, histidina y cisteína y aldehídos α,β -insaturados, así como por glicosidación/glicoxidación de grupos amino de lisina que forman productos finales avanzados de glicosidación.

La formación de compuestos carbonílicos es el marcador más general y ampliamente usado para la comprobación de oxidación severa de proteínas tanto in vitro como in vivo. La técnica de Bradford es ampliamente usada ya que es simple, rápida, barata y sensible. Es necesario construir una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras. El método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas. El CBBG se une a los residuos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595 nm, mientras que el colorante libre tiene una absorbancia máxima a 470 nm. A diferencia del método de Lowry (otra técnica colorimétrica para determinar proteínas) que es muy sensible a la composición de la solución que acompaña a las proteínas, el método de Bradford sólo es afectado por algunos detergentes. Una de las desventajas de este método es que el colorante CBBG se une fuertemente a las celdas de cuarzo. Por esto se recomienda usar celdas de vidrio o de polipropileno. Al usar celdas de polipropileno se facilita su limpieza con un poco de alcohol. ⁽⁵²⁾

17.3.2 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

En el último estado del proceso de peroxidación, los peróxidos son descompuestos a aldehídos como el malondialdehído (MDA), el que puede detectarse por reacción colorimétrica con el ácido tiobarbitúrico. También pueden evaluarse los productos finales de otros aldehídos como el hexanal. Todas ellas son llamadas especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Este método es uno de los más ampliamente usados para detectar la peroxidación en todo el organismo. ⁽⁵³⁾

Esta determinación se fundamenta en la suposición de que el malondialdehído es uno de los productos formados durante la oxidación de lípidos. El ácido tiobarbitúrico reacciona con el malondialdehído formando una red cromófora, la intensidad de ésta será proporcional al grado de oxidación de los aceites y grasas. Este método mide un producto secundario de la oxidación de los lípidos: el malondialdehído. Involucra la reacción del malondialdehído con el TBA para proporcionar un producto coloreado. La muestra a menudo es destilada para eliminar interferencias y luego se hace reaccionar con el TBA. Reacción de los aldehídos (malondialdehído) con el TBA para producir un compuesto rosa, que se mide por una curva estándar utilizando un espectrofotómetro. ⁽⁵⁴⁾

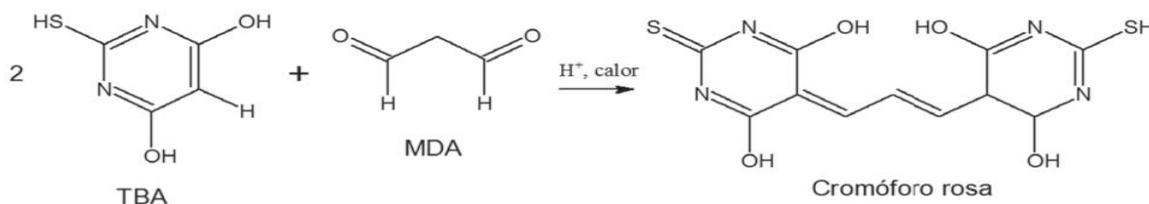


Figura 13 Reacción del MDA (Malondialdehído) con Ácido Tiobarbitúrico (TBA) para producir un derivado de color rosa. ⁽⁵⁵⁾

17.3.3 Cuantificación de Glutación por el método de Ellman

El glutatión reducido se puede rociar con reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico) el cual se fundamenta en la propiedad del reactivo Ellman de oxidar los SH libres, interaccionando con el grupo tiol para dar ácido tionitrobenzoico en una reacción equimolar para cada residuo de cisteína en una solución estabilizadora de dihidrogenofosfato de sodio. Es una reacción cuantificable que mide el número de cisteína presente en una muestra. Como resultado se obtiene la formación de un complejo amarillo que absorbe luz en la región visible del espectro, con máxima absorción a una longitud de onda de 412 nm. ⁽⁵⁶⁾

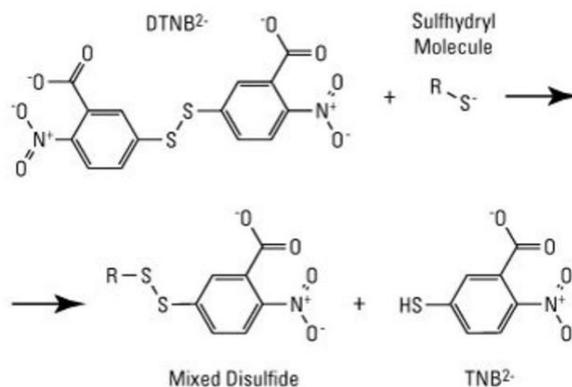


Figura 14 Reacción de formación de color del reactivo de Ellman con grupos sulfhidrido. El DTNB reacciona con grupos sulfhidrido, como las cisteínas peptídicas, para formar disulfuros mixtos y TNB, cuyo color amarillo se puede medir a 412 nm con un lector de placas o un espectrofotómetro. ⁽⁵⁶⁾

18 Sistema de defensa contra las especies reactivas de oxígeno.

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan EROs. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre. El antioxidante, al colisionar con un RLO le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un RLO débil no tóxico. No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RLO

Un antioxidante es cualquier sustancia que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser; lípido, proteína, DNA, o cualquier otro tipo de molécula El sistema de defensa antioxidante se encuentra formado por elementos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que actúan conjuntamente para así proteger a la célula. El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar el acúmulo de EROs como; el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL. ⁽⁴⁴⁾

18.1 Sistema de defensa antioxidante enzimático

18.1.1 Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es la que cataliza la dismutación de $O_2 \bullet^-$ a especies menos reactivas (O_2 y H_2O_2). En células de mamíferos existen dos tipos de SOD descritas: la enzima Cu-Zn localizada en el citosol y la enzima que contiene manganeso en su sitio activo y se encuentra en la matriz mitocondrial principalmente. Aunque esta última enzima está bajo control de procesos reguladores inducidos, por ejemplo, por interleucina 6 y los glucocorticoides, ambas enzimas catalizan la reacción de dismutación con la misma eficiencia. ⁽⁵⁹⁾

18.1.2 Catalasa

El peróxido de hidrógeno es producido por una reducción divalente del oxígeno molecular o por dismutación del $O_2 \bullet^-$. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) parece ser un buen candidato para explicar algunas de los efectos producidos por las especies reactivas del oxígeno. De hecho, el H_2O_2 es una molécula estable, no es un radical, y se puede difundir a través de membranas biológicas. La catalasa (CAT) es una enzima presente en las plantas, animales y bacterias aeróbicas; está localizada en los peroxisomas y es muy eficiente en la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y a oxígeno molecular. Cada molécula de esta enzima es capaz de convertir 6 millones de moléculas de H_2O_2 a agua y oxígeno por cada minuto. La reacción catalítica utiliza dos moléculas de H_2O_2 sin utilización de otro tipo de sustrato. ⁽⁵⁵⁾

18.1.3 Glutación peroxidasa.

Abreviada como (GPx) es una selenoproteína, que como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente. Esta enzima posee cuatro isoformas:

- GSH – Px celular: o clásica, se encuentra en todas las células y reduce el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y los convierte como se mencionó anteriormente en agua y alcohol
- GSH – Px plasmática o extracelular: es caracterizada a partir de plasma humano y se sintetiza en las células proximales al riñón
- GSH – Px fosfolípido hidroperóxido: su función es proteger contra la lipoperoxidación mediante la reducción de ácidos grasos en las membranas celulares, previene también la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad
- GSH- Px gastrointestinal: reduce los hidroperóxidos de colesterol y protege contra la toxicidad generada por la ingestión de hidroperóxidos lipídicos. ⁽⁶⁰⁾

18.2 Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas que tienen como función; capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al RL con el objetivo de estabilizarlo.

18.2.1 Vitamina C.

Se encuentra a nivel intra y extracelular en la forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo y algunos hidroperóxidos lipídicos, además de actuar sobre el tocoferoxilo, transformándolo a vitamina E. Sin embargo, el ascorbato puede llegar a ser un potente prooxidante cuando se encuentran presentes excesivas concentraciones de iones hierro y cobre. ⁽⁶¹⁾

18.2.2 Flavonoides polifenólicos.

Dentro de los flavonoides polifenólicos se encuentran un amplio grupo de compuestos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) que actúan como quelantes de metales y que además, capturan de forma in vitro ERO y ERN. Pueden ser de tipo lipo e hidrosolubles y se ubican tanto intra como extracelularmente. Dentro de este grupo se encuentran la vitamina E, la vitamina A, la ubiquinona (coenzima Q), la albúmina, el ácido lipoico, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa.⁽⁶²⁾

18.2.3 Glutati6n.

Es un tripéptido que presenta una distribuci6n tisular variable y es considerado el compuesto tiol de bajo peso molecular, de mayor abundancia en las células de los mamíferos. Actúa sobre el per6xido de hidrógeno, super6xido y el radical hidroxilo.⁽⁴⁴⁾

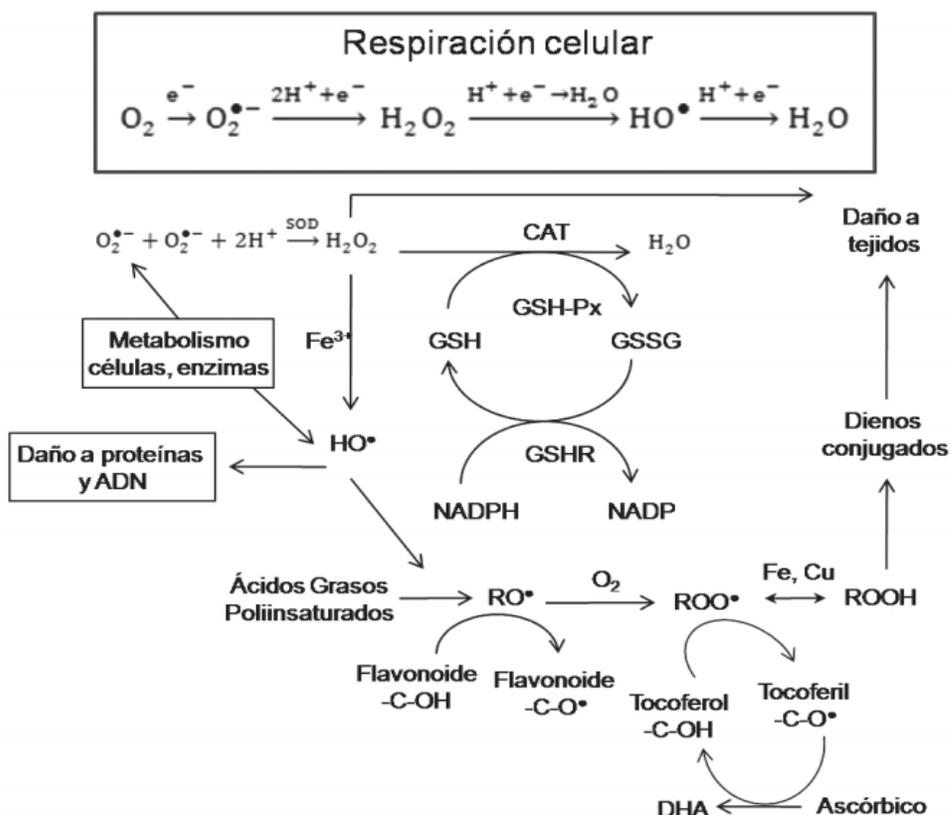


Figura 15 vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos. $O_2^{\bullet-}$: radical anión superóxido, HO^{\bullet} : radical hidróxilo, RO^{\bullet} : radical alquilo, ROO^{\bullet} : radical peróxido, $ROOH$: hidropéroxido, Fe: hierro, Cu: cobre, GSH: glutati6n reducida, GSSG: glutati6n oxidada, GSH-Px: glutati6n peroxidasa, GSHR: glutati6n reductasa, NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucle6tido Fosfato, CAT: catalasa, SOD: Superóxido Dismutasa.⁽⁵⁵⁾

19 Cultivos celulares.

Abarcan al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

19.1 Cultivos primarios.

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios

19.2 Cultivos secundarios

En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. ⁽⁶³⁾

19.3 Cultivos continuos o líneas celulares.

La mayoría de las células de los vertebrados dejan de dividirse luego de un determinado número de divisiones en cultivo, por un proceso llamado senescencia celular. Las líneas celulares son muy útiles en la investigación celular, como fuente de un gran número de células uniformes, que pueden ser conservadas y almacenadas en nitrógeno líquido (a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) por un período muy largo de tiempo, reteniendo su viabilidad y siendo un buen modelo experimental para las primeras etapas de una investigación. A pesar de la gran similitud que las células de una línea tienen entre sí, no son idénticas. La uniformidad genética en una línea celular puede mejorarse por clonado celular, a través del cual se aísla una sola célula, la que prolifera para formar una colonia de células clonales.

- **Línea celular continua:** Línea celular que ha demostrado posibilidades de ser subcultivada *in vitro* por lo menos 70 veces (≥ 70 subcultivos) indefinidamente.
- **Línea celular finita:** Línea celular que tiene un número limitado de posibles subcultivos (alrededor de 50) ⁽⁶⁴⁾

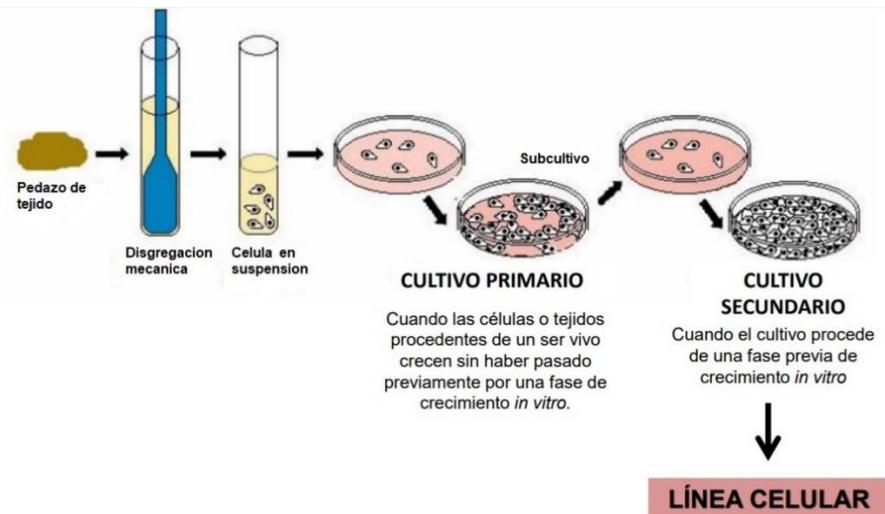


Figura 16 Esquema cultivo celular: cultivo primario y cultivo secundario ⁽⁶⁵⁾.

20 Cultivo de órganos

Implica que la arquitectura característica del tejido “in vivo” se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad. ⁽⁶³⁾

21 Explantes primarios

Constituidos por fragmentos pequeños de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie en la que generalmente crecen las células más periféricas del explante. ⁽⁶⁵⁾

22 Cultivos organotípicos

Los cultivos organotípicos han sido muy útiles en el uso de modelos in vitro para estudiar el tejido en condiciones normales y patológicas porque permite un acceso fácil y repetido de las células y un control preciso del medio extracelular. Y Consiste en cultivar las células en un ambiente tridimensional a diferencia de las placas de cultivo bidimensionales. Este tipo de cultivo 3D es bioquímica y fisiológicamente similar al tejido vivo. La heterogeneidad estructural se pierde en la mayoría, de los cultivos celulares, porque obviamente no mantienen las relaciones entre las células, o sea su conectividad. Las preparaciones organotípicas son una alternativa en la experimentación básica para el estudio de un tejido conservando de manera aproximada el contexto tisular, bajo condiciones de temperatura regulada y oxigenación permanente. ⁽⁶⁶⁾

23 Medios de Cultivo

Para el cultivo celular se utilizan placas con medios líquidos que contienen pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la supervivencia y multiplicación celular: sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas. Además, la mayoría de los medios incluyen una mezcla poco definida de macromoléculas adicionadas bajo la forma de suero fetal bovino o equino, o extracto crudo de embriones de pollo. Dichos medios se utilizan en la actualidad para los cultivos de rutina, y por lo tanto es difícil saber qué macromoléculas requiere un determinado tipo celular para funcionar y multiplicarse. Como consecuencia, se han desarrollado numerosos medios químicamente definidos, denominados “libres de suero”, que poseen, además de las pequeñas moléculas mencionadas, varias proteínas específicas necesarias para la supervivencia y proliferación, como los factores de crecimiento. Los medios de cultivo son generalmente tamponados para mantener un pH alrededor de 7,4 y tienen, además, indicadores de pH, como el rojo fenol, que cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos como resultado del metabolismo celular. Suelen agregarse también antibióticos y antimicóticos para impedir la contaminación con microorganismos. Los cultivos crecen usualmente en contenedores de plástico o vidrio con una superficie apropiada para la adhesión celular, y se mantienen en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire. ⁽⁶³⁾

24 Hígado de rata

La rata de laboratorio *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) ha sido usada como modelo para investigaciones médicas, biológicas y de diversa índole desde hace mucho tiempo. Es la especie más empleada en investigación biomédica teniendo en cuenta el volumen de información existente acerca de ella. Es interesante el hecho de que no existen descripciones detalladas de la anatomía del hígado y sus ligamentos que lo fijan a la pared pese a que existen varios artículos y libros sobre su morfología.

24.1 Anatomía

El hígado se ubicaba sobre la cara caudal del diafragma extendiéndose a ambos lados del plano mediano desde el arco costal derecho hasta el izquierdo. Presenta las caras: parietal (cranial) de forma convexa relacionada al músculo diafragma y una cara visceral (caudal) cóncava relacionada al estómago y parte craneal del duodeno ⁽⁶⁷⁾

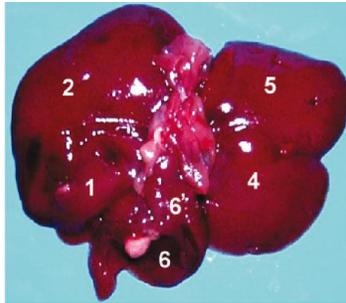


Figura 17 Cara visceral del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado ⁽⁶⁷⁾.

24.2 Fisiología celular

La gran capacidad metabólica del hepatocito reside en sus actividades enzimáticas, aportadas principalmente por: las mitocondrias, con enzimas implicadas en la cadena respiratoria, la fosforilación oxidativa, la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo del ácido cítrico, el control del metabolismo hídrico y el equilibrio iónico; los ribosomas, con enzimas encargadas de la síntesis de proteínas, muchas de ellas las propias enzimas; el retículo endoplásmico (RE) liso, que contiene gran cantidad de enzimas monooxigenasas dependientes del citocromo P450 y monooxigenasas dependientes de flavina adenina dinucleótido (FAD), y asociados al RE están los peroxisomas con alto contenido en enzimas peroxidadas.

Las funciones del hígado nos pueden dar una idea de la importancia que tiene este órgano y de la necesidad de su correcta nutrición para que funcione bien:

a) Formación y secreción de la bilis, compuesta por ácidos biliares, pigmentos biliares (glucurónidos), colesterol, fosfolípidos (lecitina), agua y electrolitos. Es de gran importancia en la digestión y absorción de las grasas.

b) Funciones anabólicas o de síntesis:

- i) Síntesis de proteínas: albúmina, proteínas transportadoras, factores de coagulación, hormonas, y factores de crecimiento, son liberadas al plasma por el hígado.
- ii) Síntesis de ácidos grasos, lipoproteínas, colesterol y fosfolípidos.
- iii) Síntesis de glucosa a partir de aminoácidos y lípidos.
- iv) Síntesis de vitaminas.
- v) Síntesis de urea eliminando el amoníaco presente en la sangre.

c) Funciones inmunológicas: realizadas principalmente por las células de Kupffer.

d) Almacenamiento: glucosa en forma de glucógeno, de vitaminas liposolubles (A, D, E) y otras hidrosolubles (K, B12), de metales (hierro y cobre).

El hígado tiene un papel vital para el organismo humano, presentando multiplicidad funcional metabólica, digestiva, hemostática, inmunológica y de reservorio. La arquitectura hepática se conforma de una serie de células. Las cuales tienen funciones específicas. ⁽⁶⁸⁾

24.3 Hepatocitos

Los hepatocitos son células poliédricas de 20 nm de longitud por 30 μm de anchura, con núcleo central redondeado u ovalado, pudiendo en 25% de los casos ser binucleados. Presentan membrana hepatocitaria, citoesqueleto con microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermediarios de citoqueratina y organelas como las mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y liso, aparato de Golgi, lisosomas y peroxisomas. El citoesqueleto tiene papel funcional en el transporte de sustancias y en la dinámica de los canalículos biliares. Las mitocondrias participan en la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos. El retículo endoplasmático rugoso se encarga de la síntesis de albúmina, fibrinógeno y diversas proteínas mediadoras de reacciones inflamatorias y de la coagulación sanguínea. En el retículo endoplasmático liso se da depósito de glicógeno, conjugación de bilirrubina, esterificación de ácidos grasos, glicogenolisis, desiodación de tiroxina, síntesis de colesterol y de ácidos biliares, metabolismo de lípidos y de sustancias liposolubles, de esteroides y de fármacos como fenobarbitúricos, alcohol y tabaco. El complejo de Golgi realiza el transporte de lípidos hacia el plasma, tiene actividad fosfatásica ácida catabólica, produce glicoproteína y promueve la adición de carbohidrato a las lipoproteínas. Los lisosomas presentan actividad fosfatásica ácida además de poseer 30 enzimas hidrolíticas responsables del catabolismo de cuerpos extraños, elementos sanguíneos envejecidos y depositar hierro. Los peroxisomas metabolizan las purinas, los lípidos, el alcohol y el peróxido de hidrogeno, participan en la gluconeogenesis, en la beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. ⁽⁶⁸⁾

24.4 Los sinusoides

Tienen un diámetro de 105 a 110 μm y ocupan de 6 a 8% de la superficie endotelial. Realizan endocitosis, intervienen en la síntesis de la matriz extracelular, con producción de colágeno IV, fibronectina, colágeno III. Producen mediadores de reacciones inflamatorias tales como interleucinas 1 y 6, prostaciclina y prostaglandinas E2 y vasorreguladores como el monóxido de nitrógeno, que representa un papel fundamental en el desarrollo de fibrosis e hipertensión portal. ⁽⁶⁸⁾

24.5 Células de Kupffer

Las células de Kupffer son células macrofágicas, móviles, ligadas a las células endoteliales, pueden representar 80 a 90 % de la población macrofágica fija del organismo, con funciones inmunitarias de fagocitosis de agentes infecciosos y de células tumorales. Sintetizan citocinas, eicosanoides y derivados reactivos de oxígeno. ⁽⁶⁸⁾

24.6 Células Estrelladas o Células de Ito

Son células perisinusoidales, tienen papel de depósito de grasa y, principalmente de vitamina A, siendo el principal almacenador de esta vitamina. Sintetizan y modulan la degradación de la matriz extracelular, produciendo colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Regulan el flujo sanguíneo sinusoidal por su capacidad contráctil en respuesta a diversos agentes como tromboxano A2, prostaglandinas F2, sustancia P y endotelinas 1 ⁽⁶⁸⁾

24.7 Células de Pit

Son de estirpe linfoide, de tipo NK y se trata de linfocitos residentes en el hígado que se sitúan en la luz del sinusoides próximas a las células endoteliales y células de Kupffer. Poseen una actividad de tipo citotóxica no dependiente de anticuerpo (natural killer), más intensa que la detectada en las células NK periféricas. ⁽⁶⁸⁾

24.8 Matriz Extracelular

Situada en el espacio porta, en continuidad con el tejido conjuntivo de la cápsula de Glisson, en el espacio de Disse perisinusoidal y en las venas centrolobulillares. Está compuesta de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. La interacción entre las células y la matriz extracelular es esencial para el mantenimiento de la homeostasia. Esta interacción es extremadamente compleja y frágil y representa un papel fundamental en la fibrosis y en la oncogénesis hepática. ⁽⁶⁸⁾

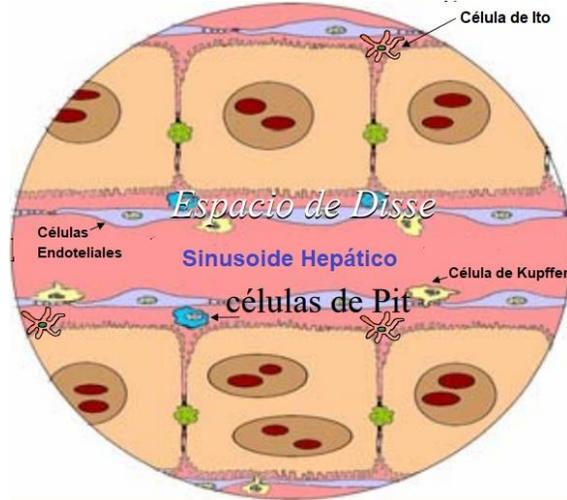


Figura 18 Arquitectura del tejido hepático.
https://www.uv.es/jcastell/1_Higado_Generalidades.pdf

25 Capacidad de Detoxificación

Algunas moléculas que no son hidrosolubles sufren ciertas reacciones enzimáticas para poder excretarlas. Entre las moléculas endógenas tenemos la bilirrubina, y las hormonas esteroideas (estrógenos, cortisol y aldosterona) y tiroideas (tiroxina), y entre las exógenas tenemos fármacos, tóxicos ambientales, aditivos alimentarios, que son denominados xenobióticos. La biotransformación se realiza por enzimas que metabolizan estos compuestos endógenos y exógenos, dando productos más hidrosolubles. Estas enzimas se pueden clasificar en dos grandes grupos, según participen en reacciones de la fase I o de la fase II. Las reacciones más representativas de la fase I son de oxidación, reducción e hidrólisis catalizadas por enzimas del Citocromo P450, mientras que las de la fase II son de conjugación con diferentes moléculas (ácido glucurónico, aminoácidos, glutatión, sulfato, metilo y acetilo). Estas enzimas se localizan en el RE, donde los xenobióticos se metabolizan secuencialmente, ya que muchos metabolitos de la fase I se someten a reacciones de conjugación ⁽⁶⁹⁾

Es destacable la capacidad de regeneración del hígado, pero no a partir de células madre, si no a partir de los diferentes tipos de células adultas, hepatocitos, endoteliales, de Ito, de Kupffer, que permanecen sanas. Sin embargo, cuando estas células están dañadas por alguna sustancia tóxica, carencia nutricional, virus, su capacidad de proliferación se reduce, pudiendo llegar a sufrir cirrosis, con proliferación excesiva de tejido conectivo que retrae el hígado y dificulta el paso de la sangre a través del mismo ⁽⁷⁰⁾

25.1 Capacidad antioxidante del hígado

El estrés oxidativo está relacionado con la patogénesis de las enfermedades hepáticas. El hígado es el responsable de la detoxificación de los xenobióticos y durante la fase I se producen moléculas muy reactivas, aunque es el metabolismo energético el gran productor de radicales libres, principalmente EROs. Para atacar a estos EROs hay que destacar a las diferentes vitaminas y al ácido alfa-lipóico (AAL) como potentes antioxidantes. La acción beneficiosa del AAL puede residir en su capacidad para reducir la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, restaurar el contenido de glutatión y mejorar la expresión mitocondrial de las enzimas antioxidantes clave, incluyendo la glutatión reductasa. El AAL es capaz de bloquear potente y directamente los radicales libres, y de actuar como regenerador (reductor) de otras moléculas antioxidantes como las vitaminas C y E, el glutatión o la coenzima Q10 que han sido oxidadas ⁽⁷¹⁾

En cuanto a los antioxidantes endógenos, la glicina y cisteína son dos de los tres aminoácidos que intervienen en la síntesis de glutatión, el antioxidante endógeno por excelencia. El otro es el ácido glutámico, uno de los aminoácidos no esenciales más abundantes en el organismo humano. Asegurar los niveles de glutatión es una garantía en el control del estrés oxidativo ⁽⁷²⁾

Un micronutriente de gran importancia en el control del estrés oxidativo es el Selenio, el cual se integra en enzimas y otras proteínas ligado al aminoácido cisteína (selenocisteína). Hay varias selenoproteínas que intervienen en el control del equilibrio redox (reducción-oxidación), una de las más importantes es la glutatión peroxidasa-4 (GPx-4) cuya actividad es reducir el glutatión que resulta oxidado al reducir los hidroperóxidos de fosfolípidos de membrana. Otro enzima de esta familia, la glutatión peroxidasa-1 (GPx-1), se relaciona con la detoxificación de lipoperóxidos y peróxidos de hidrógeno. Sus niveles dependen de la disponibilidad de selenio, y se localiza en el citoplasma y las mitocondrias de toda clase de células ⁽⁷³⁾

25.2 Hígado detoxificador:

Dentro de las reacciones de conjugación que tienen lugar durante la fase II, son muy importantes las que se producen por conjugación con glutatión, y con aminoácidos como la taurina y la glicina. De especial importancia es la intervención del pull hepático de taurina sobre la eliminación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través de los ácidos biliares, evitando la disminución del pull hepático de cisteína

Para activar la expresión de las enzimas glucuronosiltransferasas son importantes los fitoquímicos, muy beneficiosos como flavonas, curcumina, las cuales van a catalizar la glucuronización de muchas moléculas nocivas, como la bilirrubina, durante la fase II. Para adyugar a esta actividad, es importante la goma arábiga (GA) que es el producto natural de mayor contenido en ácido glucurónico. Aunque no es esta la única actividad que ejerce la GA sobre el metabolismo hepático, ya que recientemente se ha demostrado su capacidad para promover la eliminación intestinal de los ácidos biliares y reducir el nivel en plasma de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) ⁽⁷⁴⁾

La silimarina (aportada por el Cardo mariano) ha sido utilizada como tratamiento protector en enfermedades hepáticas agudas y crónicas. Además, ayuda a las células hepáticas mediante una acción multifactorial, que incluye su unión a las membranas celulares para impedir la penetración de las toxinas hepatotóxicas en ellas, incrementar la actividad SOD, incrementar los niveles tisulares de glutatión, inhibir la peroxidación lipídica, incrementar la síntesis protéica y estimular la regeneración celular. La actividad hepatoprotectora de silimarina puede ser explicada por sus propiedades antioxidantes derivadas de la naturaleza fenólica de sus flavolignanos, que se ha demostrado que inhiben la producción de leucotrienos, lo que puede explicar su actividad anti- inflamatoria y antifibrótica ⁽⁷⁵⁾

26 Etanol

El etanol es un líquido transparente e incoloro que se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye por todo el cuerpo. Tiene actividad bactericida y se usa a menudo como desinfectante tópico. Se usa ampliamente como solvente y conservante en preparaciones farmacéuticas, además de ser el ingrediente principal de las bebidas alcohólicas. De hecho, el etanol tiene un uso generalizado como disolvente de sustancias destinadas al contacto humano o al consumo, incluidos aromas, aromatizantes, colorantes y medicamentos. El etanol tiene un efecto depresivo sobre el sistema nervioso central. El etanol tiene un modo de acción complejo y afecta a múltiples sistemas en el cerebro, sobre todo actúa como un agonista para los receptores GABA. La muerte por consumo de etanol es posible cuando el nivel de alcohol en la sangre alcanza 0.4%. Un nivel en sangre de 0.5% o más es comúnmente fatal. Niveles de incluso menos de 0.1% pueden causar intoxicación, y la pérdida de conocimiento a menudo ocurre en 0.3-0.4%.⁽⁷⁶⁾



Figura 19 Estructura química del etanol⁽⁷⁶⁾

26.1 Toxicidad del etanol

Actualmente se identifica al acetaldehído, como primer producto de la oxidación celular del etanol, como uno de los efectores primarios que desencadena parte de los efectos tóxicos. Esta molécula altamente reactiva es capaz de inactivar a los grupos sulfhidrilo de las enzimas, además de producir aductos con proteínas y fosfolípidos de la membrana, alterando su estructura y por ende, su función.⁽⁷⁷⁾

Las concentraciones sanguíneas de alcohol logradas en situaciones usuales de la vida social, oscilan entre 50 y 75 mg por 100 ml de sangre. Con esta concentración el estado subjetivo suele ser de tranquilidad agradable y un ligero grado de sedación. Suelen aparecer signos de borrachera por concentraciones de 100 a 200 mg por 100 ml y se observan intoxicaciones intensas con niveles superiores a 200 mg por 100 ml.; con concentraciones de 400 mg por 100 mililitros se produce estupor, coma o ambos; y las concentraciones superiores a 500 mg por 100 ml. de sangre suelen causar la muerte.⁽⁷⁸⁾

26.1.1 Intoxicación Aguda

La intoxicación etílica aguda consta con las siguientes fases: pseudoexcitación por desinhibición, hipnosis, narcosis y parálisis respiratoria. Se trata manteniendo la respiración, la presión arterial, la glucemia, y la temperatura corporal hasta que el etanol se elimine completamente del organismo. La piridoxina intravenosa antagoniza parcialmente los efectos neurológicos del etanol, este efecto es más evidente en un derivado suyo el pidolato de piridoxina o metadoxina con el que se han realizado varios ensayos clínicos controlados en el alcoholismo agudo y crónico.⁽⁷⁹⁾

26.1.2 Intoxicación crónica

La intoxicación etílica crónica es un caso particular de la dependencia de hipnóticos. Consta con alteraciones digestivas, trastornos nutritivos por carencias vitamínicas y proteicas, alteraciones hepáticas, hipomagnesemia, alteraciones neurológicas.⁽⁷⁹⁾

26.2 Toxicocinética – Absorción

El etanol se absorbe por difusión pasiva a favor de gradiente, por vía oral, pulmonar, o cutánea y escasamente en boca esófago, y en estómago: 20-25 %, y en Intestino Delgado: 75-80 %. El

pico (nivel máximo) se alcanza a la hora, aproximadamente. Si hay alimentos se precisan 2-6 horas para que sea completa.

Modifican la absorción la presencia de alimentos, las comidas copiosas o con alto contenido en proteínas, la disminución/incremento en la capacidad de absorción gástrica y el retraso y/o aceleración en el vaciamiento gástrico. ⁽⁸⁰⁾

26.3 Toxicocinética- Distribución

Debido a las diferencias genéticas entre hombres y mujeres, el volumen de distribución del etanol será diferente en cada caso (0.7 L/kg en hombres respecto a 0.6 L/kg en mujeres). Este hecho, junto con la tendencia media de un menor peso corporal de las mujeres provoca mayores niveles de etanol en sangre en éstas ante un mismo consumo de etanol. De forma similar, el incremento en la grasa corporal que se observa con la edad en varones produce que ante una ingestión de la misma cantidad de etanol, las concentraciones séricas de etanol sean mayores en personas de mayor edad. El etanol cruza sin dificultad la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica. Con idéntica facilidad, el etanol accede a los pulmones desde el torrente sanguíneo y se vaporiza en el aire a una velocidad constante, siendo por ello posible determinar la concentración sérica de este alcohol desde los niveles contenidos en el aire exhalado. ⁽⁸¹⁾

26.4 Toxicocinética-Biotransformación.

El etanol se biotransforma por oxidación no microsómica en el citosol y por vía microsómica. La enzima alcohol deshidrogenasa transforma el etanol en acetaldehído. La enzima acetaldehído deshidrogenasa transforma el acetaldehído en ácido acético que en forma de acetil CoA la cual entra en el ciclo de Krebs, y sirve para la formación de cuerpos cetónicos, síntesis de colesterol y derivados (hormonas corticosuprarrenales y sexuales, vitamina D, ácidos biliares), síntesis de ácidos grasos y reacciones de conjugación de fármacos (N-acetilación de sulfonamidas, isoniacida, ácido p-aminosalicílico). ⁽⁸⁰⁾

La alcohol deshidrogenasa cataliza la conversión reversible de los alcoholes a sus correspondientes aldehidos y cetonas utilizando NAD (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido) como cofactor. Existen también otros dos sistemas enzimáticos hepáticos que posibilitan esta misma reacción y que adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol o alguna deficiencia en el sistema principal. Estos dos sistemas son el llamado sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrógeno (Compuesto I).

La rapidez en la Biotransformación del etanol dependerá fundamentalmente de la integridad de los sistemas enzimáticos (más activos en bebedores habituales sanos) y de la predisposición genética (acetiladores rápidos/lentos). El incremento de los niveles de acetaldehído y la depleción de glutatión y de S-adenosilmetionina interviene en la formación de radicales libres y la consiguiente citotoxicidad. Se atribuye a la degradación de la Vitamina B6 por el acetaldehído y a sus consecuencias sobre el sistema GABAérgico la aparición de temblores y convulsiones. ⁽⁸¹⁾

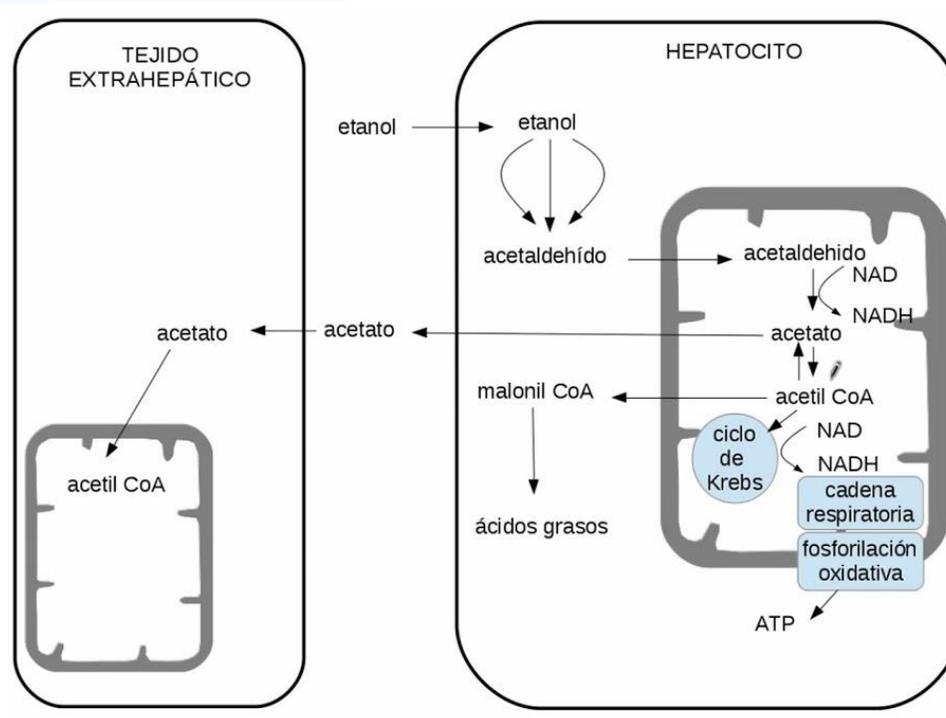


Figura 20 Biotransformación del etanol en el hepatocito. ⁽⁸¹⁾.

26.5 Toxicocinética – Excreción

El 5-10% se elimina por aliento, orina, sudor o leche materna (sin Biotransformar). La detección en orina se da de 30-220 min. Los niveles de alcoholuria pueden ser menores, similares o superiores a los de alcoholemia, según la fase. ⁽⁸⁰⁾.

- Aclaramiento renal: 86.4 a 154.2 mg/kg/h.
- Aclaramiento total: 0,186 g/L por hora

27 Sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo hepático del etanol.

27.1 Alcohol Deshidrogenasa

En los seres humanos, pero también en roedores, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) es un sistema que implica varios genes y alelos que dan lugar a diferentes subtipos de enzimas. Los distintos isoenzimas se han agrupado en tres clases: ADH clase I (contiene las subunidades α , β , γ), ADH clase II (subunidad π) y ADH clase III (subunidad χ). Para las subunidades β y γ se ha descrito polimorfismo, de tal forma que la existencia en la ADH2 de diferentes alelos para la subunidad β (β_1 , β_2 , β_3) y en la ADH3 alelos para la subunidad γ (γ_1 , γ_2 , γ_3), produce diferencias en las propiedades cinéticas de cada isoenzima. No obstante, y debido a su baja afinidad por el sustrato, la clase III de ADH no parece participar en la oxidación del etanol, incluso aunque se alcancen altas concentraciones en plasma. ⁽⁸²⁾

La presencia de la subunidad β_1 es muy común entre la población caucasiana; la subunidad β_2 se encuentra mayoritariamente en poblaciones orientales y la subunidad β_3 se ha descrito en algunas poblaciones africanas. La isoenzima de la ADH2 que contiene la subunidad β_2 fue identificada como una ADH atípica por Von Wartburg et al en 1965 y si se compara con la ADH2 típica (sólo β_1), esta oxida el etanol más rápidamente. Al menos, los individuos con dicha isoforma de la enzima acumularían mayores niveles de acetaldehído tras el consumo de etanol. ⁽⁸¹⁾

27.2 MEOS (P450 CYP2E1)

MEOS (sistema microsomal de oxidación del etanol), localizado en el retículo endoplasmático de las células. Este sistema enzimático es miembro de la familia de los citocromos microsomales P450, y la denominación actual más extendida para este sistema es P450 CYP2E1, que corresponde a la proteína purificada El citocromo 2E1 puede ser inducido por la administración crónica de alcohol en hígado. Esta inducción está asociada con una oxidación del alcohol en todos estos tejidos, y de este modo, parece estar ligada a la síntesis de acetaldehído. Sin embargo, su inducción puede llevar a hepatotoxicidad, debido a que muchos tóxicos potenciales requieren del metabolismo microsomal para ejercer sus efectos deletéreos sobre la célula. ⁽⁸³⁾

27.3 Catalasa- alcohol peroxidasa

Se encuentra en todos los organismos aeróbicos y todo indica que su función es degradar rápidamente peróxido de hidrógeno. La catalasa es uno de los más activos catalizadores producidos por la naturaleza. Es única entre las enzimas que degradan H_2O_2 porque lo hace de una manera muy eficiente energéticamente por ello se ha propuesto como sistema regulador de la homeostasis de peróxido de hidrógeno en la célula. Dependiendo de la concentración de peróxido, ejerce una función dual. A bajas concentraciones actúa de modo que una variedad de donadores de hidrógeno, como el etanol, el metanol o el ácido ascórbico, pueden ser oxidados. A altas concentraciones de sustrato, la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno rápidamente sirviéndose de una reacción catalítica en la cual el H_2O_2 actúa tanto como aceptor, como donador de moléculas de hidrógeno ⁽⁸⁴⁾

Las pruebas espectrofotométricas y cinéticas sugieren que la catalasa utiliza un mecanismo de dos pasos en la reacción peroxidática y en la catalítica. En el primer paso el hierro del grupo hemo de la catalasa interacciona con el peróxido de hidrógeno para formar peróxido de hidrógeno rico en hierro.



Este peróxido de hierro intermediario (CATFe-OOH) es denominado Compuesto I, puede ser detectado in vitro e in vivo. A bajas concentraciones de H_2O_2 , el compuesto I puede ser reducido por donores de hidrógeno como el etanol.



Parece ser, que en diferentes órganos de los mamíferos la catalasa funciona de esta manera. En órganos como el hígado, donde hay altas concentraciones de catalasa, se encuentran también bajos niveles de H_2O_2 . Si la actividad de la catalasa se inhibe, las concentraciones de peróxido aumentan en el hígado. Las contribuciones de la catalasa al metabolismo hepático del etanol pudieran verse seriamente comprometidas, ya que los niveles de peróxido de hidrógeno presentes en el organismo pudieran ser insuficientes para posibilitar el nivel de funcionamiento hepático. ⁽⁸⁵⁾

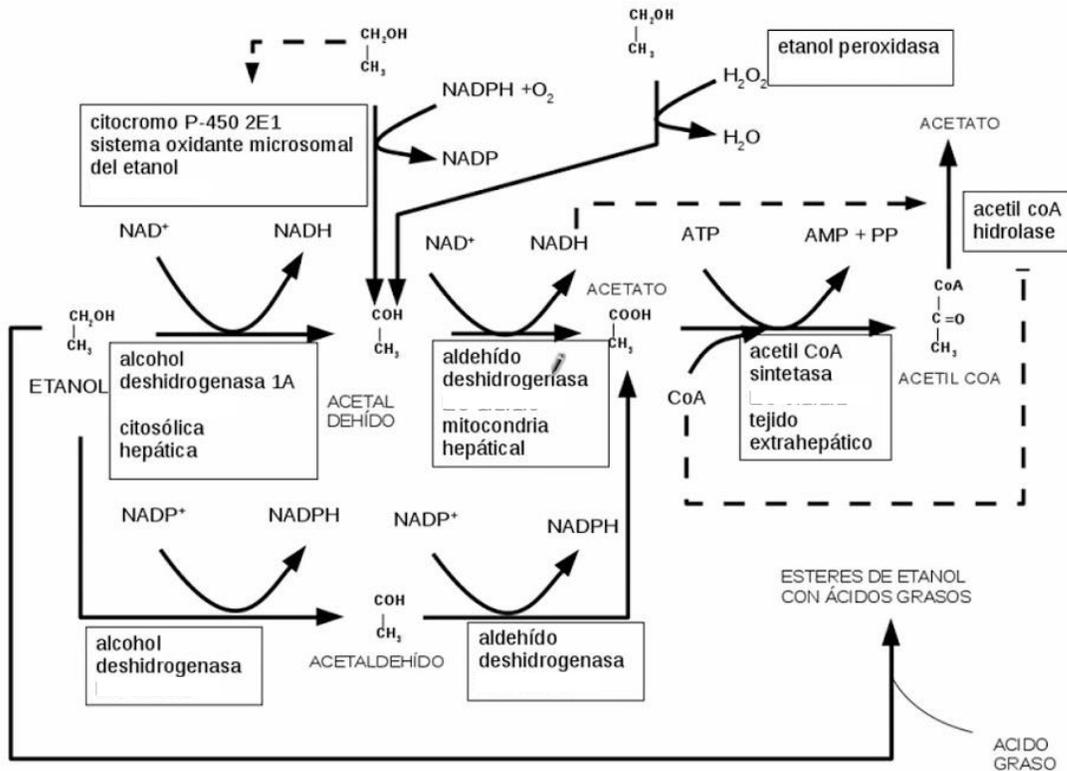


Figura 21 Rutas metabólicas de la biotransformación del etanol (Imagen con modificación) ⁽⁸⁵⁾.

28 Glutión

El glutión (GSH) es una molécula única que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, teniendo un rol central en la defensa contra el daño oxidativo. El GSH (L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina que se encuentra presente en el citoplasma de todas las células. La forma oxidada de la molécula, GSSG, se encuentra principalmente en forma extracelular. Las concentraciones de GSH y GSSG y su relación molar son indicadores de la funcionalidad celular y su alteración está relacionada con varios procesos patológicos en el hombre. ⁽⁸⁶⁾

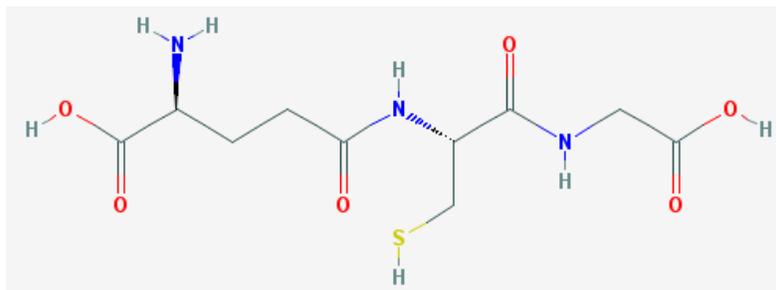


Figura 22 Estructura química del glutión ⁽⁸⁷⁾.

Esta molécula es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, donde se encuentran las mayores concentraciones. La molécula se encuentra libre y unida a proteínas. La concentración total de glutatión (GSht) es la suma de la fracción de glutatión libre y la fracción de glutatión unida a proteínas. A su vez, la fracción libre está integrada por la forma tiol reducida llamada glutatión reducido (GSH) y la forma oxidada o disulfuro. La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se la encuentra en el interior de las células en concentraciones milimolares en el rango de 0,1 a 10 mM, en tanto que extracelularmente se encuentran niveles micromolares de GSH. El grupo activo de la molécula está representado por el grupo tiol (-SH) del residuo de cisteína

Dentro de las células, GSH se encuentra predominantemente en su forma reducida, excepto en el lumen del retículo endoplasmático donde existe sólo en su forma oxidada (GSSG). Entre un 10 a un 15% del GSH intracelular se encuentra en la mitocondria donde alcanza una concentración de 10 a 12 mM en tanto que en el citosol la concentración es de 7 mM. Esta diferencia de concentración se debe a que en el interior de la mitocondria no se encuentra la enzima catalasa, por lo tanto, GSH es el encargado de inactivar el peróxido de hidrógeno generado durante los procesos oxidativos que ocurren en la matriz mitocondrial. ⁽⁸⁸⁾

La concentración de GSH en el compartimento mitocondrial es más importante para la supervivencia celular aún más que el GSH que se encuentra en el citosol. Considerando el volumen de la matriz extracelular, la concentración de GSH mitocondrial es similar a la que se encuentra en el citosol. Las mitocondrias no poseen las enzimas que permiten la síntesis de GSH, por esta razón, todo el GSH que se encuentra en el compartimento mitocondrial proviene del citosol. Existe un sistema de transporte que permite el pasaje de GSH desde el citosol hacia la mitocondria. A pH fisiológico, GSH se encuentra como una molécula aniónica cargada negativamente. Bajo estas condiciones, puede atravesar libremente la membrana mitocondrial externa, en tanto que en la membrana mitocondrial interna el pasaje del tripéptido se produce a través de dos transportadores de aniones:

- El transportador dicarboxilato (DIC).
- transportador 2-oxoglutarato (OGC).

El primero incorpora GSH dentro de la mitocondria por intercambio de fosfato inorgánico y el segundo por intercambio de 2-oxoglutarato

Si bien la mayor cantidad de GSH presente en la célula se encuentra repartido en el citoplasma y la mitocondria, el retículo endoplasmático representa un reservorio de pequeñas concentraciones de la forma oxidada de glutatión (GSSG). Existe un transporte preferencial de GSSG desde el citosol hacia el retículo endoplasmático. La forma oxidada actúa como fuente de equivalentes de oxidación para crear el ambiente necesario para el ensamble y la secreción de proteínas. ⁽⁸⁶⁾

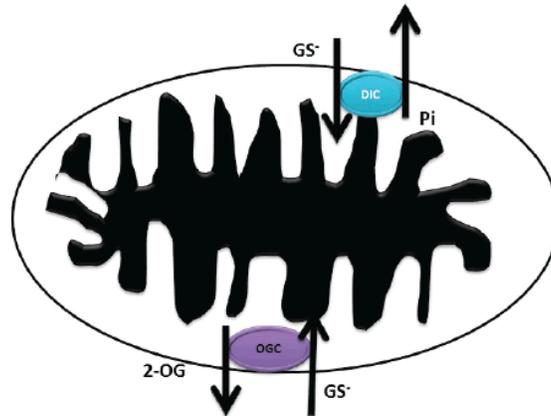


Figura 23 Transporte mitocondrial de GSH. El anión GS^- atraviesa libremente la membrana mitocondrial externa. El pasaje de GSH desde la membrana mitocondrial interna hacia la matriz se realiza mediante dos transportadores de aniones. El transportador dicarboxilato (DIC) que intercambia fosfato inorgánico (Pi) por GSH y el transportador 2-oxoglutarato (OGC) que intercambia 2-oxoglutarato (2-OG) por GSH. ⁽⁸⁶⁾

El hígado es el órgano que posee las concentraciones más altas de GSH y es un órgano central en dos aspectos importantes para la biosíntesis de GSH:

1. Los hepatocitos son las únicas células que tienen la habilidad de utilizar metionina para la síntesis de GSH a través de la vía de la transulfuración, en la cual la metionina es convertida a cisteína y luego esta última es utilizada en la síntesis de GSH.
2. La síntesis hepática de GSH depende de la velocidad de exportación de GSH al plasma, bilis y mitocondria mediante los distintos sistemas de transporte.

La alta concentración de GSH en el hígado se relaciona con la función de este órgano en la detoxificación y eliminación de compuestos xenobióticos. Los sustratos para la conjugación con GSH incluyen un gran número de compuestos electrofílicos o bien de sustancias que han sido transformadas durante las reacciones de fase I en moléculas electrofílicas. La distribución de GSH dentro del hígado es heterogénea, los hepatocitos periportales contienen el doble de la concentración de GSH que los de la zona centrolobulillar. ⁽⁸⁸⁾

28.1 Mecanismos de transporte de GSH en el hepatocito

Las células son impermeables a GSH; hasta la fecha no ha sido identificado ningún transportador que permita el ingreso de GSH al espacio intracelular. Todo el GSH que se encuentra dentro de las células es sintetizado a partir de sus aminoácidos precursores, para los cuales hay sistemas de transporte hacia el interior celular. Por lo tanto, entran aminoácidos precursores y se exporta GSH, GSSG y conjugados de GSH.

Los aminoácidos cisteína y glicina ingresan al hepatocito a través del transportador ACS dependiente de Na^+ . El aminoácido glicina también puede ingresar por el transportador Gly dependiente de Na^+ y Cl^- . En el hepatocito el glutamato ingresa transportado por el transportador aniónico X_{AG} . ⁽⁸⁹⁾

La caracterización e identificación molecular de los transportadores para el flujo de salida de GSH permanecen poco definidas. Han sido identificados dos mecanismos transportadores en la membrana plasmática de los hepatocitos, uno de ellos es mediado por la proteína de resistencia múltiple, (Mrp1 y Mrp2); el otro es mediado por el transportador de solutos orgánicos (Oat1) que intercambia solutos orgánicos hacia el interior de la célula y libera GSH. En el hepatocito, el transporte de GSH y sus conjugados hacia la bilis es mediado principalmente por Mrp2 en tanto que Mrp1 y Oatp1 contribuyen al transporte de GSH hacia la sangre. ⁽⁸⁶⁾

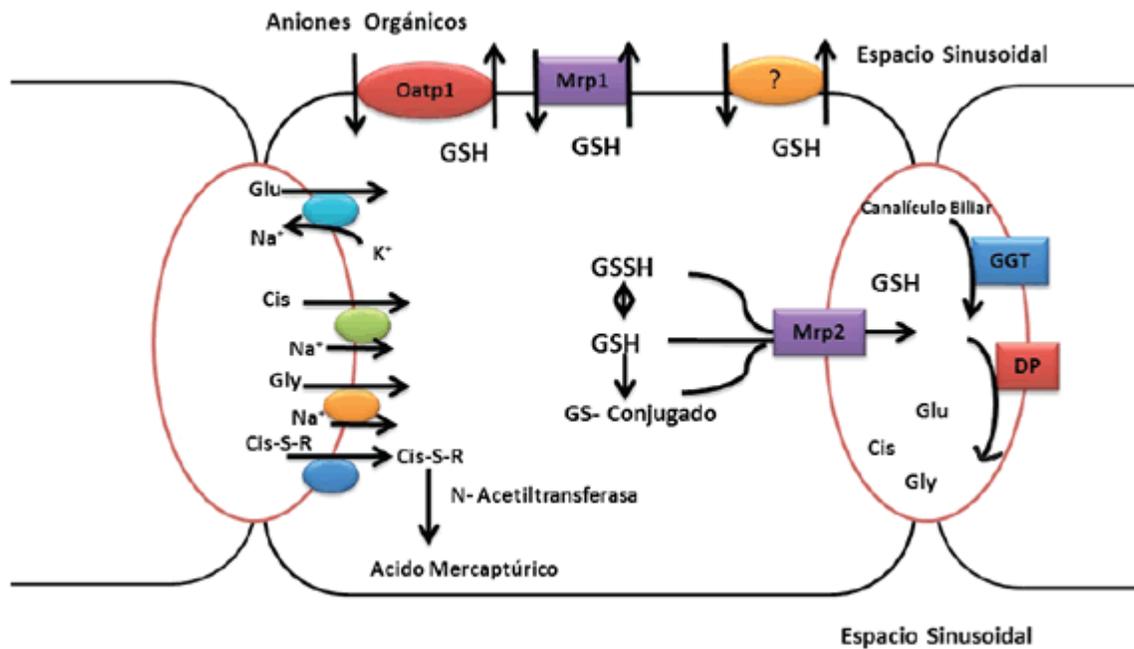


Figura 24 Mecanismos de transporte GSH y de ácido glutámico (Glu), cisteína (Cis) y glicina (Gly) en el hepatocito. La figura muestra el ingreso de los aminoácidos desde el espacio extracelular por medio de transporte activo. GSH es exportado tanto al espacio sinusoidal como al canalículo biliar, por los transportados Mrp1, Mrp2y el transportador de solutos orgánicos (Oatp).⁽⁸⁶⁾

28.2 Detoxificación de xenobióticos por GSH

La molécula tiene dos características estructurales que le permiten llevar a cabo sus funciones. Una de ellas es la unión γ -glutamil entre los aminoácidos glutamato y cisteína. Esta particular unión se produce entre el grupo amino de la cisteína y el γ -carboxilo del glutamato, en lugar del enlace α -carboxilo que se encuentra en las proteínas. Como consecuencia, el enlace promueve la estabilidad intracelular ya que el tripéptido sólo puede ser degradado extracelularmente por la enzima GGT. La otra característica es la presencia del grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína. Este grupo es altamente reactivo, facilitando la participación de GSH en un gran número y en una gran variedad de funciones

La función más importante del GSH es la detoxificación de xenobióticos y sus metabolitos. El tripéptido tiene un rol importante en la detoxificación de una gran variedad de compuestos, conjugándose con estos para luego ser excretados por orina o heces bajo la forma de derivados de ácidos mercaptúricos. Estos compuestos se caracterizan por ser electrofílicos y forman conjugados con GSH en reacciones espontáneas o bien en reacciones enzimáticas que están mediadas por la enzima GSH

28.2.1 Glutación S-transferasa

La glutación S-transferasa-pi (GSTpi), un miembro de esta familia de enzimas de fase II de detoxificación, cataliza la reacción de detoxificación intracelular, en la que se incluye la inactivación de carcinógenos electrofílicos⁽⁹⁰⁾

El tripéptido tiene un rol importante en la detoxificación de una gran variedad de compuestos, conjugándose con estos para luego ser excretados por orina o heces bajo la forma de derivados de ácidos mercaptúricos. Estos compuestos se caracterizan por ser electrofílicos y forman conjugados con GSH en reacciones espontáneas o bien en reacciones enzimáticas que están mediadas por la enzima GSH-S-transferasa

Los conjugados formados son excretados fuera de la célula y hacia la bilis en el caso de los hepatocitos. Luego de su excreción, en el espacio extracelular actúa sobre ellos la enzima GGT liberando la fracción cisteinil-glicina-conjugado sobre la que actúa la enzima DP, el cisteinil conjugado resultante es acetilado y liberado como ácido mercaptúrico ⁽⁸⁶⁾

28.2.2 Glutación como indicador de estrés oxidativo

Debido a que las concentraciones sanguíneas de glutación reflejan el estado del glutación en otros tejidos menos accesibles, las mediciones del glutación reducido (GSH) y el glutación disulfuro (GSSG) en sangre se consideran esenciales como índice del estado del GSH en todo el cuerpo y es un indicador útil del estado de estrés oxidativo en humanos.

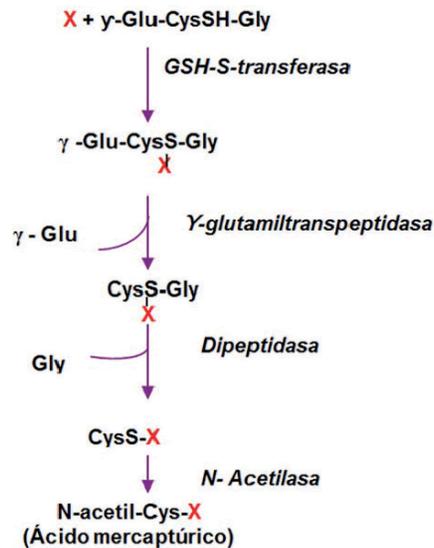


Figura 25 Conjugación con GSH y detoxificación de xenobióticos a través de la vía del ácido mercaptúrico. X es un compuesto electrofílico que puede conjugarse con GSH en una reacción catalizada por la enzima GSH S-transferasa. La fracción γ glutamil luego es desdoblada por la ectoenzima GGT, liberando el conjugado cisteinilglicina, el cual luego es hidrolizado por DP, resultando en la formación del cisteinil conjugado. Luego se continúa con la N-acetilación formando ácido mercaptúrico. ⁽⁸⁶⁾

28.3 Función antioxidante.

Los intermediarios formados tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pueden llevar a la formación de formas tóxicas del oxígeno que causan peroxidación lipídica y daño celular. GSH reacciona con los intermediarios reactivos del nitrógeno.

El peróxido de hidrógeno formado durante el metabolismo aeróbico es metabolizado formando GSSG. La reacción ocurre por la acción de la enzima glutación peroxidasa, tanto en el citosol como en la mitocondria y también por la enzima catalasa que está ausente en la mitocondria. El GSSG formado luego es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando así un ciclo de óxido-reducción. Los peróxidos orgánicos (ROOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la glutación peroxidasa o la enzima GSHT-transferasa. En condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de la célula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, GSSG es activamente transportado fuera de la célula o bien reacciona con los sulfidrilos de las proteínas para formar disulfuros mixtos (PSSH) ⁽⁹¹⁾

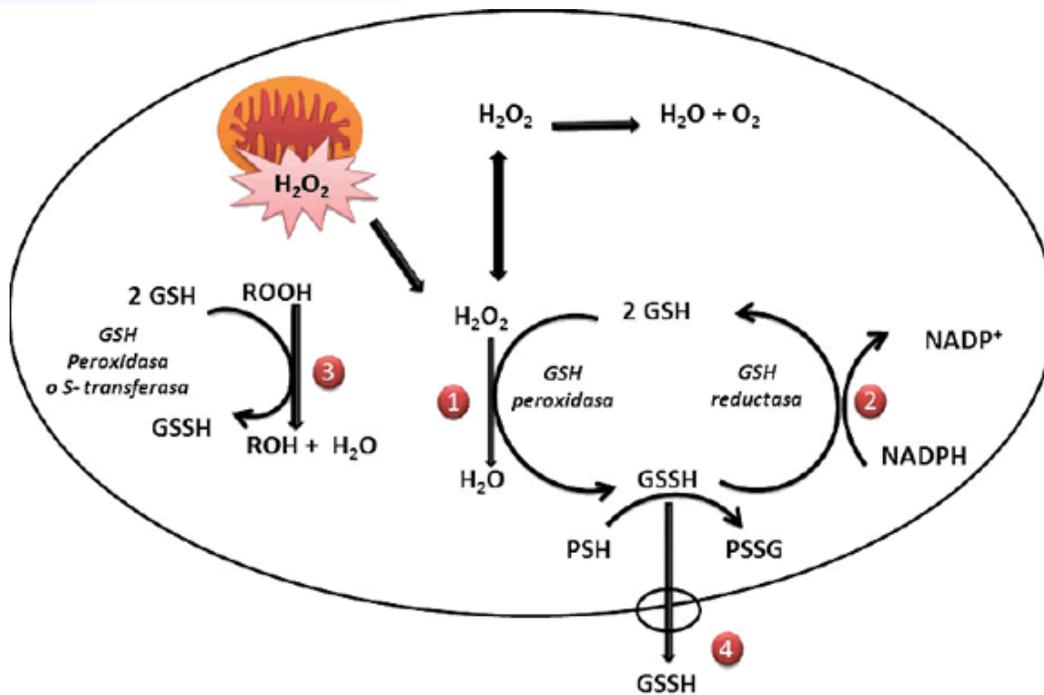


Figura 26 Función antioxidante de GSH. 1) El peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo aeróbico es metabolizado por la enzima GSH peroxidasa formando GSSG. 2) GSSG formado en la reacción anterior es reducido por la enzima GSH reductasa utilizando NADPH como cofactor. 3) Los peróxidos orgánicos formados pueden ser reducidos por GSH peroxidasa. 4) El GSSG formado durante el estrés oxidativo que no puede ser reducido a GSH es exportado de la célula para mantener el equilibrio redox. ⁽⁸⁶⁾.

29 Materiales y Métodos

Elaboración de nanopartículas de Quitosan - Glutación reducido.

Para la elaboración de las nanopartículas de quitosan – Glutación reducido se utilizó la técnica de gelación ionotrópica, Primero en una solución de 20 mL de ácido acético glacial al 1 % con un pH de 4.2 se adiciono tripolifosfato (TPP) al 0.1 % y se dejó agitar por 30 minutos (Solución A). En otros 20 mL de solución de ácido acético al 1 % con pH de 4.2, se dejó humectar por 10 minutos Pluronic F-68 al 1 %, trascurrido el tiempo de humectación, se disolvió quitosan al 3 % y Glutación reducido al 1 %, una vez adicionado el Glutación reducido, la solución formada se mantuvo a una temperatura menor a 10 °C y se dejó en agitación constante por 30 minutos (Solución B).

El siguiente paso es de vital importancia para la formación de las nanopartículas de quitosan - Glutación reducido, en la solución B que permanece en agitación, se adiciona la solución A en un promedio de 1 gota por segundo, una vez que se adiciono toda la solución de TPP, se dejó en agitación constante por un tiempo de 1 hora. Para saber que las nanopartículas se habían formado, se observó que la solución tenía una tonalidad blanca y de aspecto turbio.

Con la finalidad de homogenizar el tamaño de partícula, la solución de nanopartículas se filtró por papel filtro, posteriormente se utilizó un embudo de vidrio borosilicato del sistema de filtración milipore, junto con una membrana de nitrocelulosa de 0.65 μM . Por último para que las nanopartículas fueran estériles, y bajo condiciones de esterilidad, se utilizó el mismo sistema de filtración de milipore pero con una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μM .

Las nanopartículas se recibieron en un tubo fálcon, nuevo y estéril, y se guardaron bajo refrigeración a 4 °C

29.1 Elaboración de nanopartículas control de Quitosan

En la formación de nanopartículas de quitosan, como un sistema de control, se utilizó la misma técnica que la elaboración de nanopartículas de Quitosan - Glutación reducido, solo que en la solución B no se adiciona el Glutación reducido, por lo que estas nanopartículas, no están cargadas. Y también se mantendrán en condiciones de esterilidad.

29.2 Caracterización de Nanopartículas

29.2.1 Concentración de Nanopartículas y Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE)

Se tomaron 5 mL de sistema nanoparticulado, (NP-Q y NP-Q-GSH) y se colocaron en un tubo para ultracentrifuga el cual contenía 5 mL de glicerol, posteriormente se adicionaron 20 mL de solución de ácido acético al 1 % y se ultracentrifugo a 42,000 G por un tiempo de 1 h. Al finalizar el tiempo, se extrajo el anillo que se formó en la interfase.

Una vez finalizada la centrifugación se determinó el GSH encapsulado. La cuantificación se realizó en el sobrenadante, en el cual se encuentra una cierta cantidad de GSH libre, se tomaron 50 uL de sobrenadante y se adiciono en una placa de 96 pozos, posteriormente se adiciono 150 uL de búfer de reacción (preparado con el reactivo de Ellman) y se tomó la lectura espectrofotométrica a 450 nm

La eficiencia de encapsulación se realizó mediante la siguiente ecuación.

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de GSH dentro de las NP}}{\text{Cantidad teorica de GSH en las NP}} * 100$$

29.2.2 Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó realizando una dilución 5:1000 uL de sistema nanoparticulado (NP-Q y NP-Q-GSH) el cual se leyó en el equipo nano sight NS 300 obteniendo el tamaño de partícula promedio así como la poli dispersión del tamaño de las nanopartículas. Y se obtuvo la cantidad de nanopartículas por mililitro.

30 Exposición Tratamientos en cultivos organotípicos de hígado de rata en base al esquema experimental.

30.1.1 Preparación de cultivos organotípicos

Para la realización de esta experimentación se utilizaron 6 ratas Wistar de aproximadamente 4 semanas de edad, el sacrificio fue por medio de dislocación cervical, se extrajo el hígado del cual se seleccionó el lóbulo medial derecho.

Del lóbulo seleccionado, se realizó un corte de 25 mm² de área, posteriormente se colocó en el equipo Vibratomo ajustado a 250 micras de grosor.



Figura 27 Cortes de tejido hepático

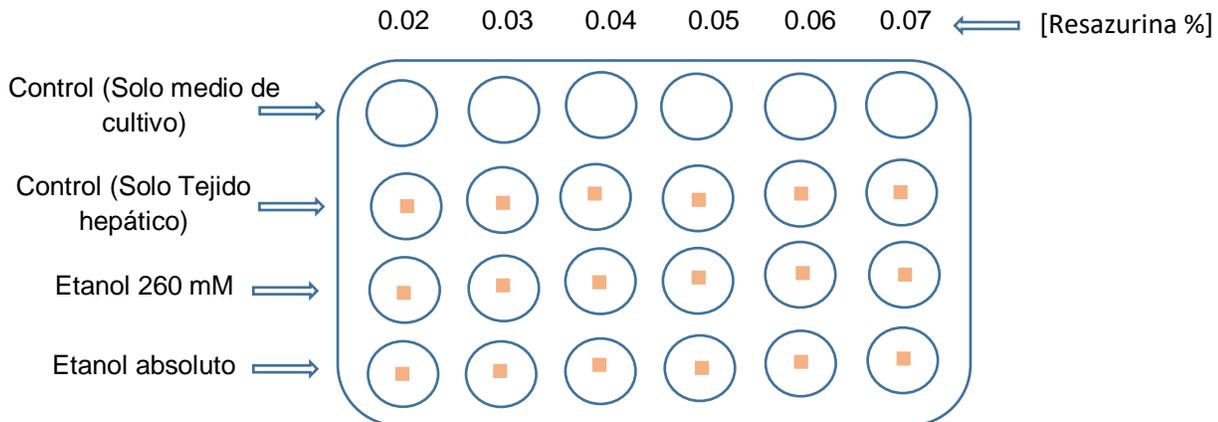
Con la finalidad de poder limpiar el exceso de eritrocitos que puedan quedar presentes en el tejido, los cortes realizados serán trasvasados en una serie de las siguientes soluciones

- Búfer Hk (20 °C)
- Búfer PBS (Temperatura ambiente)
- Búfer PBS (37 °C)

Una vez colocados en el último enjuague, los cortes se colocan respecto al esquema experimental correspondiente.

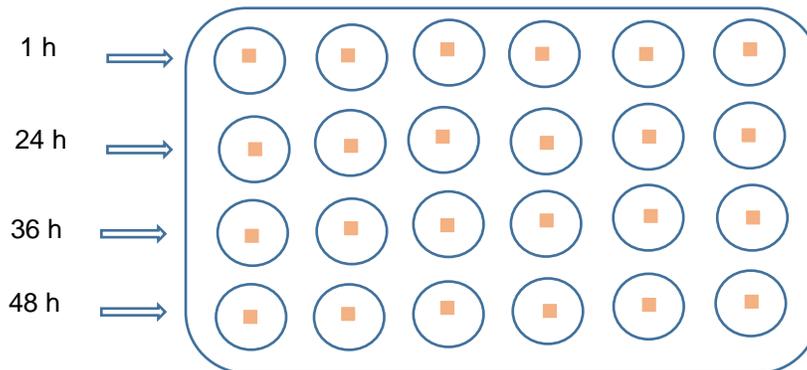
30.1.2 Determinación de concentración de resazurina en cultivo organotípico de hígado de rata

Se trasvasaron 18 cortes de tejido hepático en Medio DMEM 1 X y se incubaron 1 h a 37 °C y 5 % de CO₂ bajo el siguiente esquema de experimentación en 800 µL volumen final. Una vez pasado el tiempo se observó la coloración rosa para poder realizar la lectura espectrofotométrica a 595 nm.



30.1.3 Viabilidad de Tejido.

Se trasvasaron 24 cortes de tejido hepático en 800 µL de Medio DMEM 1 X e incubar a 37 °C y 5 % de CO₂ bajo el siguiente esquema de experimentación. Una vez transcurrido el tiempo de exposición realizar la técnica de resazurina descrita



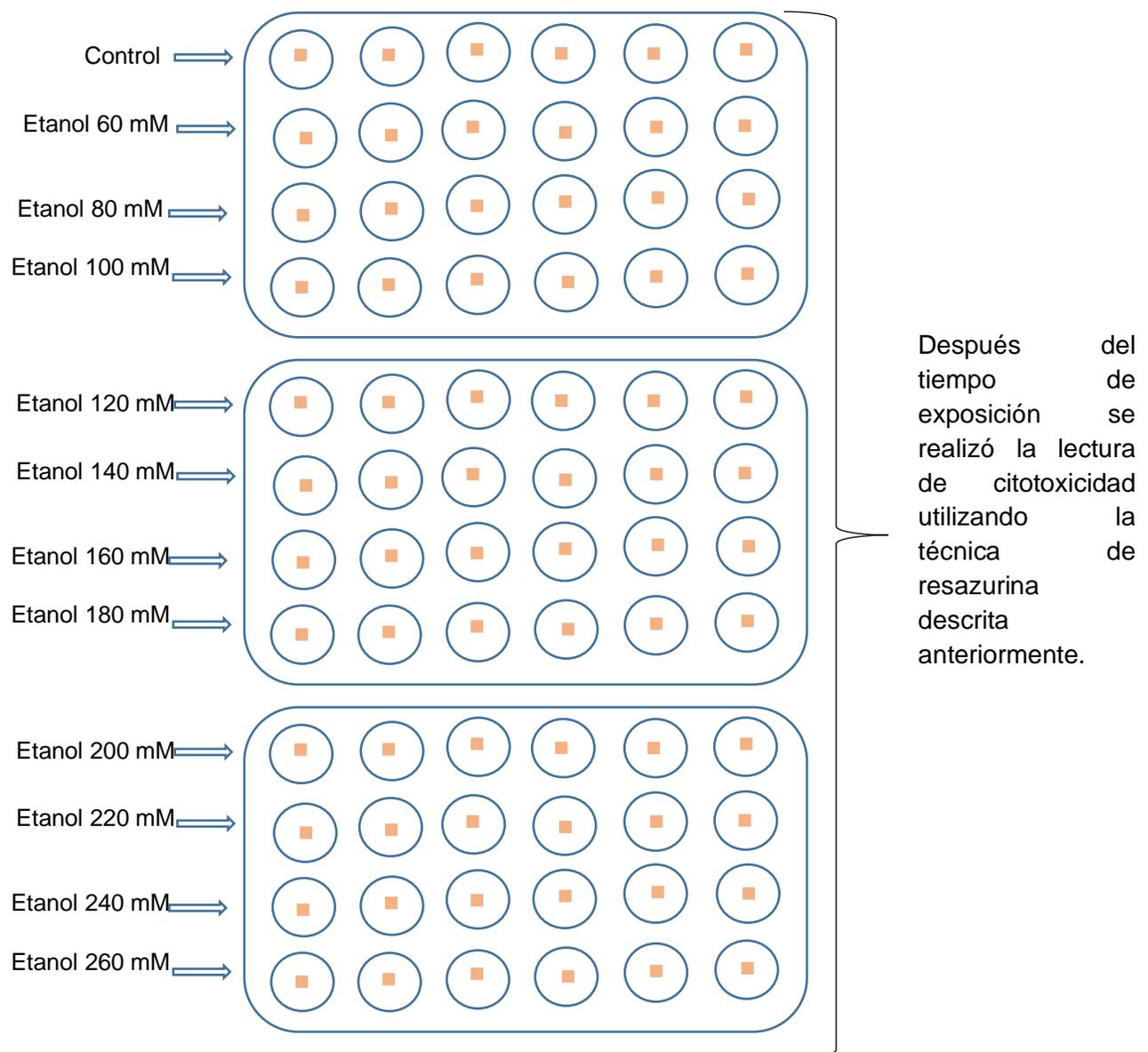
30.1.4 Técnica de resazurina

Después del tiempo de exposición se realizó la lectura de citotoxicidad celular a través del siguiente procedimiento:

- Retirar el medio de cultivo
- Adicionar medio de cultivo junto con resazurina al 0.03 %
- Incubar 1 h
- Tomar 200 μ L de medio y colocarlos en una placa de 96 pozos
- Leer la absorbancia a 595 nm
- Realizar los cálculos para obtener el porcentaje de citotoxicidad

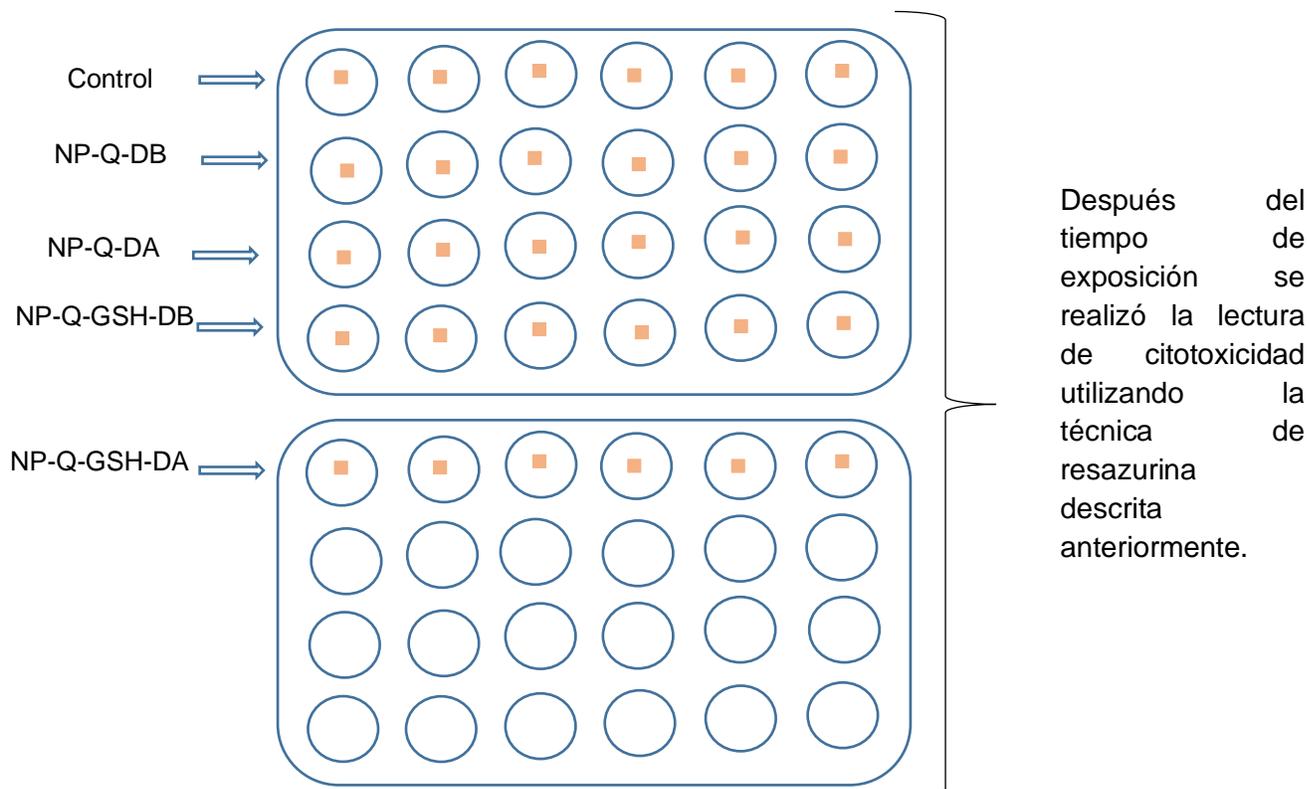
30.2 Curva de citotoxicidad de Etanol

Se trasvasaron 72 cortes de tejido hepático en 800 μ L volumen final utilizando medio DMEM 1 X e incubar por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂ bajo el siguiente esquema de experimentación.



30.3 Curva de citotoxicidad de Nanopartículas de Quitosan y Quitosan-Glutatión reducido

Se Trasvasaron 30 cortes de tejido hepático en 800 μ L volumen final, utilizando Medio DMEM 1 X e incubaron por 24 h a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂ bajo el siguiente esquema de experimentación. Utilizando las concentración de Nanopartículas de Quitosan-Glutatión reducido de 0.06 mM (DB) y 0.6 mM (DA), reportadas en el laboratorio 9 de toxicología celular de la unidad de Investigación multidisciplinar, y se utilizó el mismo volumen de las nanopartículas de Quitosan-Glutatión Reducido basándose en la cantidad de nanopartículas por mililitro.



30.4 Exposición de Nanopartículas después de la exposición de etanol

Se Trasvasaron 36 cortes de tejido hepático en 800 μ L volumen final utilizando Medio DMEM 1 X e incubaron por 24 h a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂ bajo el siguiente esquema de experimentación.

Después de las 24 h de exposición en etanol, se reemplazó el medio de cultivo utilizando nuevamente Medio DMEM 1 X y nanopartículas de Quitosan y Quitosan-Glutatión Reducido, y se incubaron por 4 h a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂ bajo el siguiente esquema de experimentación.

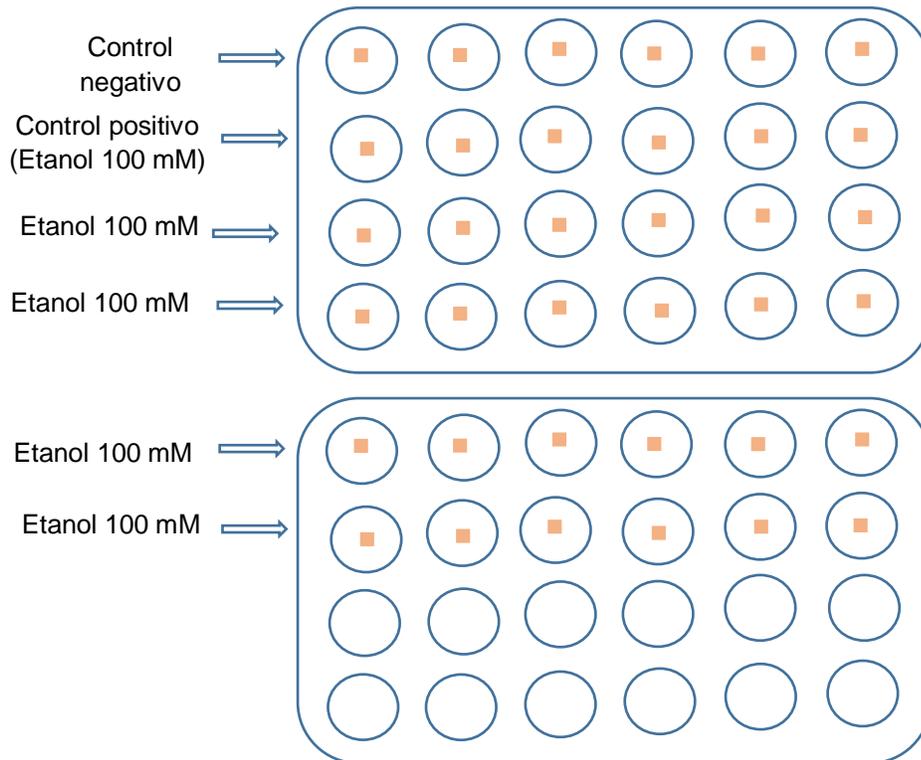
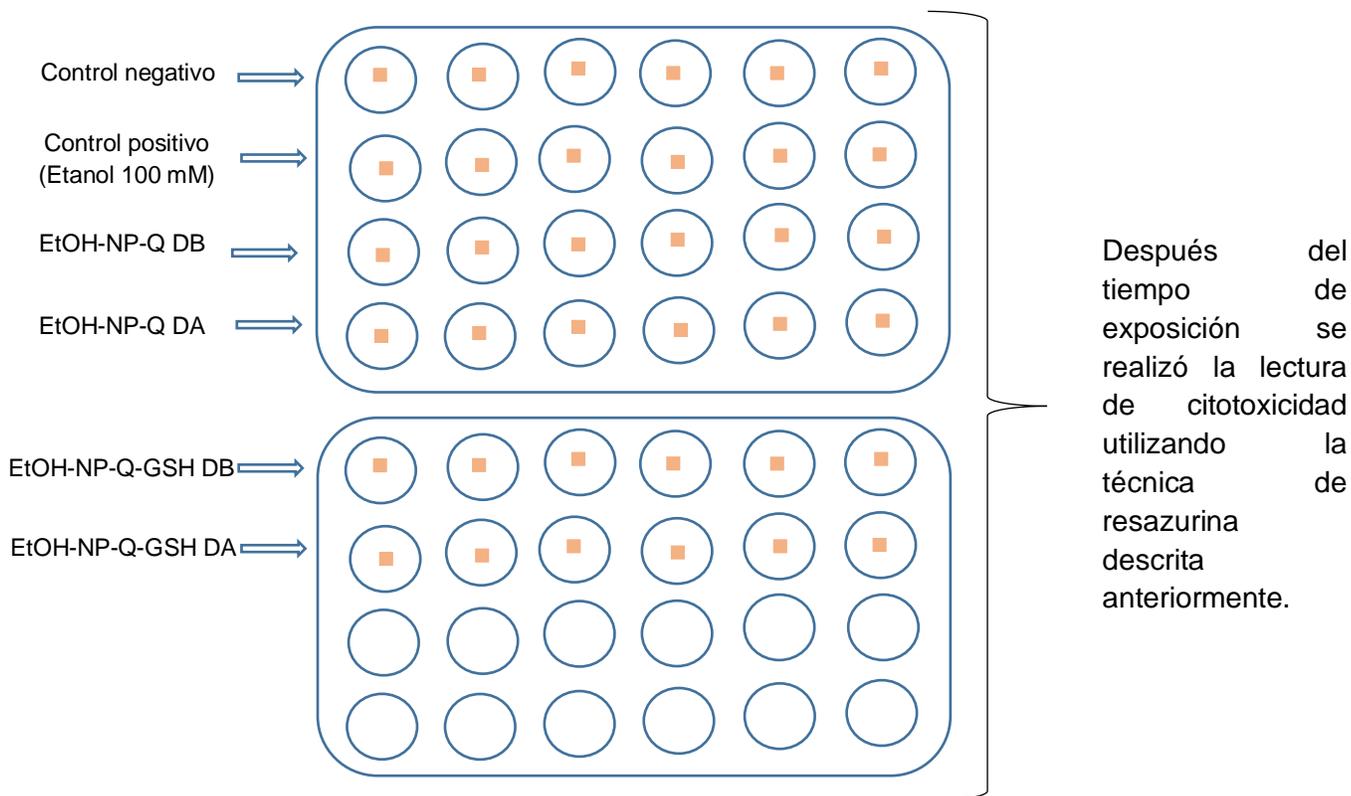


Tabla 5 Tratamientos utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante de NP- NQ-GSH

Tratamientos	Concentración utilizada
Control negativo	-
Control positivo Et-OH	100 mM
EtOH-NQ DB	Volumen adicionado de acuerdo a la cantidad de NP de GSH adicionado
EtOH-NQ DA	
EtOH-NQ-GSH DB	0.06 mM
EtOH-NQ-GSH DA	0.6 mM



30.5 Evaluación de los marcadores para estrés oxidativo.

30.6 Tratamiento de la muestra

- Se colocó cada uno de los tejidos en 300 μ L de Búfer de Lisis.
- Luego se sónico el tejido a 3 pulsos de 10 seg al 97 %
- Se centrifugo a 12 000 RPM por 15 minutos

30.6.1 Determinación de Proteínas

- Se colocaron 10 μ L del sobrenadante junto con 190 μ L de Buffer PBS
- De la solución anterior se tomaron 10 μ L y se depositaron en una placa de 96 pozos
- Se adicionaron 190 μ L del reactivo de Bradford diluido (1mL Bradford :4 mL Agua)
- Incubar de 5-10 min a temperatura ambiente
- Y se tomó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm

30.6.2 Determinación de actividad enzimática Catalasa

- En un tubo de ensaye se adicionaron 100 μL de triton 100 X al 1 %
- Se Adicionaron 100 μL de sobrenadante
- Posteriormente se incubo el tubo a 37 °C por 15 min
- Se adicionar 100 μL de H_2O_2 al 30 %
- Se incubo por 3 min a 37 °C
- Por último, se midió la altura de la espuma formada y se cuantifico

30.6.3 Determinación de GSH

- Se Tomaron 75 μL de sobrenadante y se depositaron en un tubo ependorf
- Se adicionaron 7.5 μL de Ácido sulfosalicilico al 5 % y se Incubo por 15 min
- Posteriormente se centrifugo a 12 000 RPM por 15 min
- Se Recuperaron 50 μL de sobrenadante y se colocaron en una placa de 96 pozos.
- Luego se adicionaron 150 μL del Reactivo de Ellman
- Se Incubar por 15 min a 37 °C
- Y se tomó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm

30.6.4 Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

- Se tomaron 75 μL de sobrenadante y se depositaron en un tubo ependorf
- Se adicionaron 75 μL de HClO_4 al 2.5 %
- Y se Incubo por 15 min a 37 °C
- Luego se centrifugo a 12 000 RPM por 15 min
- Se recuperaron 150 μL de sobrenadante y se colocaron en un tubo nuevo
- Después se adicionaron 150 μL de Ácido Tiobarbiturico al 0.67 %
- Se Incubo a 90 °C durante 30 min
- Posteriormente se dejar enfriar y colocaron 200 μL en una placa de 96 pozos
- Y se tomó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 535 nm

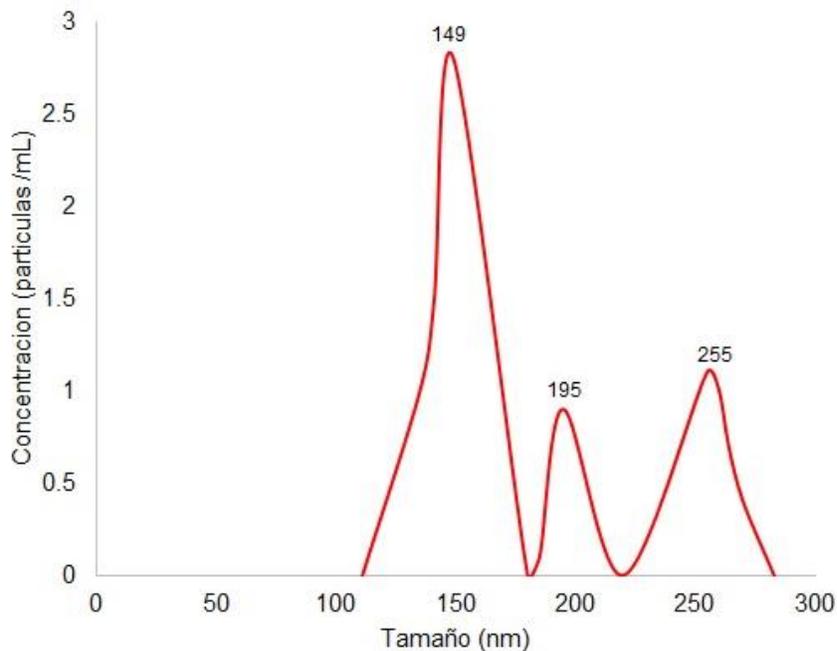
30.7 Análisis estadístico

Para la realización de este proyecto se manejó por 2 experimentos independientes cada uno por sextuplicado teniendo una $n = 12$. Los datos fueron analizados utilizando el análisis estadístico LSD al 95 % de confianza. Las letras iguales en los gráficos indican que no hay diferencias significativas.

31 Resultados y Discusión

31.1 Caracterización de Nanopartículas.

31.1.1 Tamaño

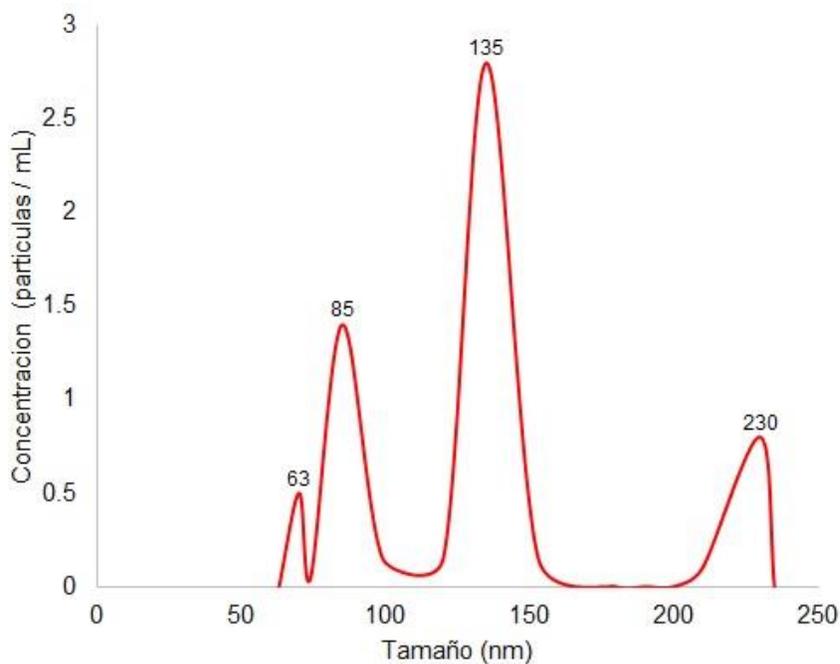


Media: 185.9 nm

Moda: 147.9

Concentración: 2.47×10^8 partículas / mL

Gráfico 1 Tamaño de Nanopartícula de Quitosán con Glutión



Media: 145.3 nm

Moda: 139.1

Concentración: 1.95×10^8 partículas / mL

Gráfico 2 Tamaño de Nanopartículas de Quitosán

31.1.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación.

Concentración de NP-GSH preparadas

$$\frac{214.2 \text{ mg de GSH pesados}}{40 \text{ mL de NP}} \times \frac{1 \text{ mmol de GSH}}{307.32 \text{ mg de GSH}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 17.42 \text{ mM}$$

Absorbancia de las NP-Q-GSH a 405 nm: 0.8147143

Absorbancia del blanco a 405 nm: 0.1411429

Diferencia: 0.6735714

Ecuación de la recta: $y = 0.0081 X + 0.1068$

$$\text{Concentracion no encapsulada} = \frac{0.6735714 - 0.1068}{0.0081} = 0.0699 \text{ mM}$$

La eficiencia de encapsulación se realizó mediante la siguiente ecuación.

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de GSH dentro de las NP}}{\text{Cantidad teorica de GSH en las NP}} * 100$$

$$EE (\%) = \frac{17.3501}{17.42} * 100 = 99.5987 \% \text{ de encapsulacion}$$

Las Nanopartículas de Quitosán y Quitosán con Glutatión, fueron desarrolladas bajo la técnica de Gelación ionotrópica la cual ocurre de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento, en este caso la principal razón de la formación son las interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del Tripolifosfato ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), el cual en solución acuosa actúa como agente entrecruzante con los grupos $-NH_3^+$ del Quitosán, y con la utilización de Pluronic F-68 como agente estabilizador y protector de la intercalación del Glutatión entre las cadenas del Quitosán.

El tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y a la fuerza iónica, por este motivo durante el proceso de la elaboración de las nanopartículas se debe de ajustar el pH a un valor de 4 - 4.5 ya que en este intervalo el Quitosán favorece la formación de la nanopartícula además de que el Glutatión es estable ante la degradación. ⁽³²⁾

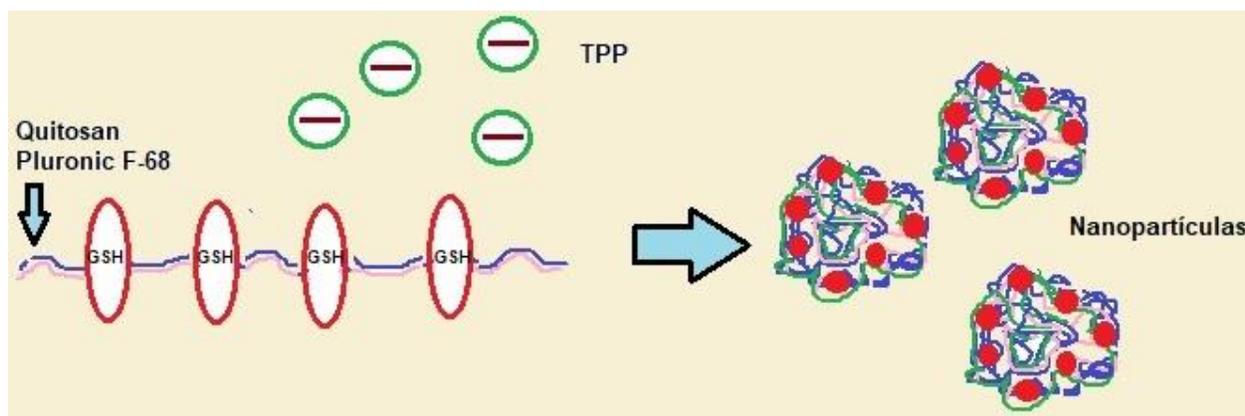


Figura 28 Formación de las Nanopartículas de Quitosán - GSH

Para calcular el porcentaje de encapsulación de GSH, se cuantifico la concentración del tripeptido mediante la técnica del reactivo de Ellman, en donde el ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico se encarga de oxidar los grupos SH libres, e interacciona con el grupo tiol de la molécula de cisteína de la estructura química del GSH, formando un complejo de color amarillo. Es así como se demostró que el porcentaje de encapsulación fue del 99.5987 % lo cual indica que las NP-Q-GSH cumplieron con una concentración de 17.3501 mM. ⁽⁵⁶⁾.

La determinación del tamaño de partícula, se realizó con el equipo Nanosight NS 300, el cual a través del movimiento browniano de las nanopartículas y la utilización de la dispersión de la luz, se observó que las NP-Q tienen un tamaño promedio de 145.3 nm mientras que las de NP-Q-GSH cuentan con un tamaño aproximado de 185.9 nm y a pesar de las dispersiones de tamaño que presentan ambas nanopartículas, estas cuentan con un tamaño ideal para poder atravesar las membranas celulares y poder liberar el GSH, ya que el tamaño de las nanopartículas no debe de ser mayor de 200 nm debido a que pueden activar el sistema inmunológico y ser aclaradas en la sangre por las células Kupffer pero tampoco deben de ser menores a 5 nm para evadir la filtración directa por los riñones ^{(14) (34) (35)}

Con base a la caracterización de las nanopartículas, se calculó la cantidad de nanopartículas utilizadas en los diferentes tratamientos. Tomando en cuenta que para las NP-Q se utilizó el mismo volumen adicionado de la cantidad de NP-Q-GSH, justificando en base a la relación cantidad de nanopartículas existentes por mL, por lo que fue necesario calcular la cantidad de Nanopartículas que se depositaron en los diferentes tratamientos descritos a continuación:

Tabla 6 Concentraciones de los diferentes tratamientos utilizados

Tratamientos	Concentración utilizada	Cantidad de Nanopartículas
control	-	-
NP-Q CB	Volumen adicionado de acuerdo a la cantidad de NP de GSH	5.85 x 10 ⁸ partículas / mL
NP-Q CA		5.85 x 10 ⁹ partículas / mL
NP-Q-GSH CB	0.06 mM	7.41 x 10 ⁸ partículas / mL
NP-Q-GSH CA	0.6 mM	7.41 x 10 ⁹ partículas / mL
Et-OH	100 mM	-

31.2 Evaluación de la capacidad Antioxidante de Nanopartículas en cultivo Organotípico de hígado de rata Wistar

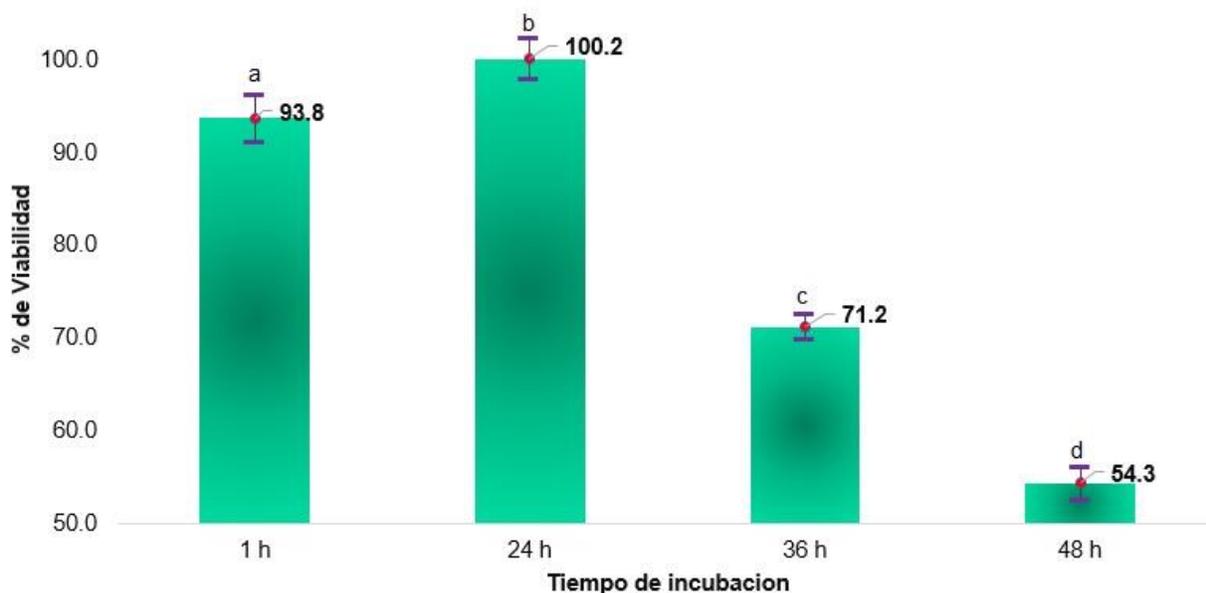


Gráfico 3 Viabilidad del cultivo organotípico de hígado de rata Wistar, expuesto a diferentes horas de incubación. Promedio de experimentos independientes Utilizando LSD al 95 % de confianza.

De acuerdo al gráfico No 3 Se realizó la determinación del tiempo de vida del cultivo organotípico óptimo para el desarrollo de los estudios de citotoxicidad, después de 1 hora se muestra una disminución en la viabilidad del tejido, esto sucede porque el tiempo es corto para que el tejido se adapte al medio de cultivo así como a las condiciones de incubación.

Mientras que a las 24 h se observa que la viabilidad aumenta y este se tomó como el tiempo máximo en donde podemos tener un cultivo viable y útil para conocer la respuesta del hígado in situ expuesto a diferentes concentraciones de etanol. Los resultados muestran que después de las 36 h la viabilidad del tejido disminuye significativamente, por lo que a las 48 h de incubación el tejido ya no se encuentra metabólicamente activo comprometiendo ampliamente su viabilidad.

Para la estimación de la citotoxicidad se utilizó la técnica de rezasurina el cual es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción, en el que el colorante azul se vuelve rosa fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular causado principalmente en las mitocondrias de las células vivas. ⁽⁹³⁾

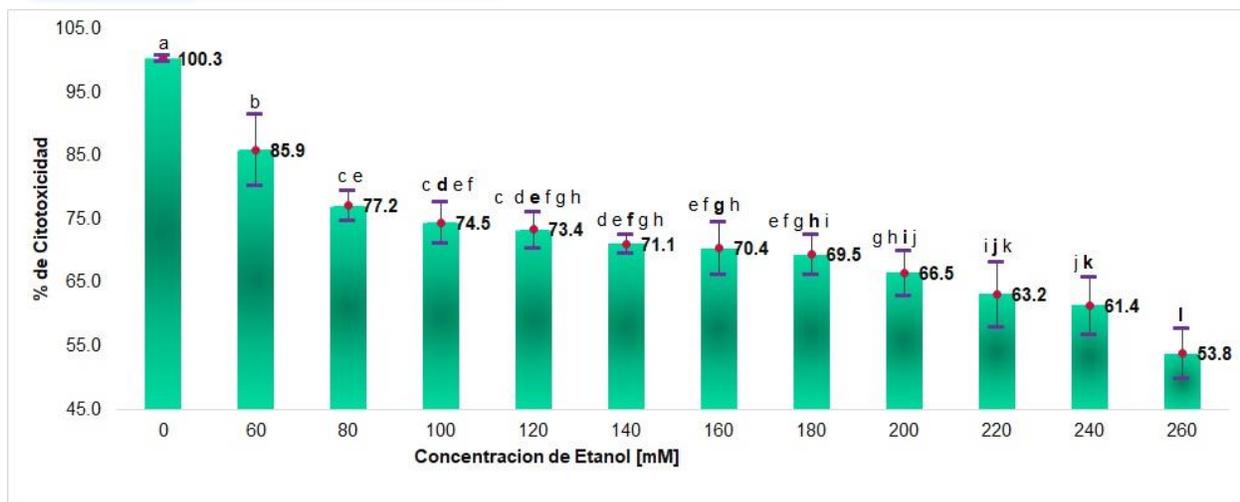


Gráfico 4 Curva de citotoxicidad de cultivo organotípico de hígado de rata Wistar, expuesto a diferentes concentraciones de etanol, por 24 horas de incubación Primer experimento independiente. Utilizando LSD al 95 % de confianza.

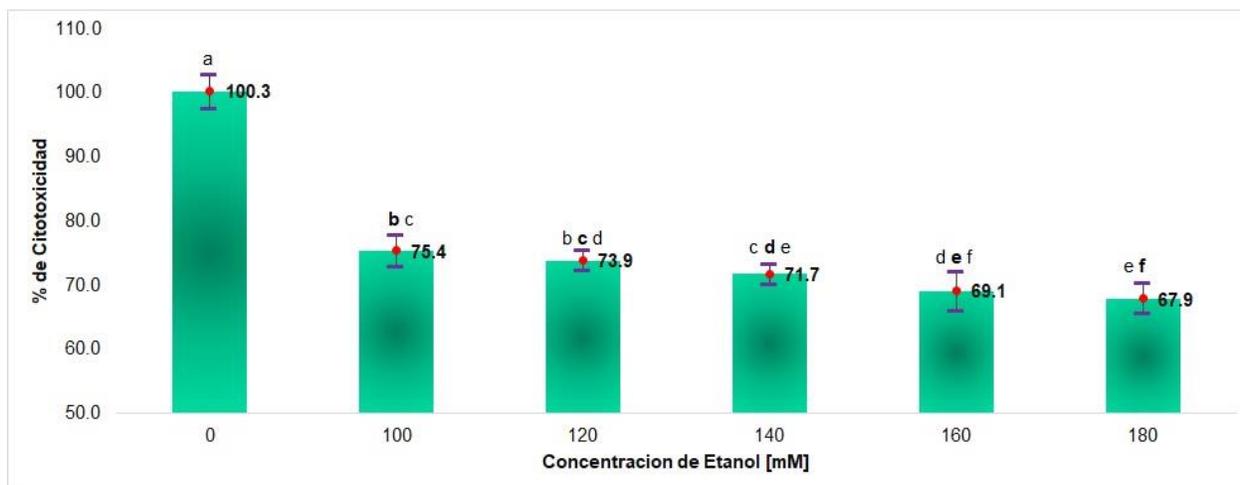


Gráfico 5 Efecto citotóxico en el cultivo organotípico de hígado de rata Wistar inducido por etanol durante 24 horas. Promedio de experimentos independientes con un rango específico de concentración de Etanol. Utilizando LSD al 95 % de confianza.

Al observar la gráfica No 4 Se demuestra que la viabilidad del cultivo organotípico disminuye con forme aumenta la concentración de Etanol, el objetivo fue disminuir la viabilidad celular en un 70 % ya que este porcentaje es el ideal para poder evaluar estudios de citotoxicidad. Obteniendo un margen de concentración de 100 mM a 180 mM donde no se aprecian diferencias significativas entre estas concentraciones de etanol, además el porcentaje de viabilidad disminuye alrededor del 70 % y se decidió realizar una segunda curva de citotoxicidad la cual se observa en el gráfico No 5 en el que tampoco existen diferencias significativas entre la concentración de 100 mM a 140 mM, sin embargo a partir de la concentración de 160 mM se observa que el porcentaje de citotoxicidad empieza a disminuir por debajo del 70 %, por lo que se descartó utilizar concentraciones más elevadas de etanol. Es así como se decidió utilizar la concentración de 100 mM como la ideal para generar el estrés oxidativo y evaluar el efecto antioxidante de las nanopartículas preparadas a base de Quitosán y glutatión sobre la citotoxicidad del etanol inducida en el cultivo organotípico de hígado de rata.

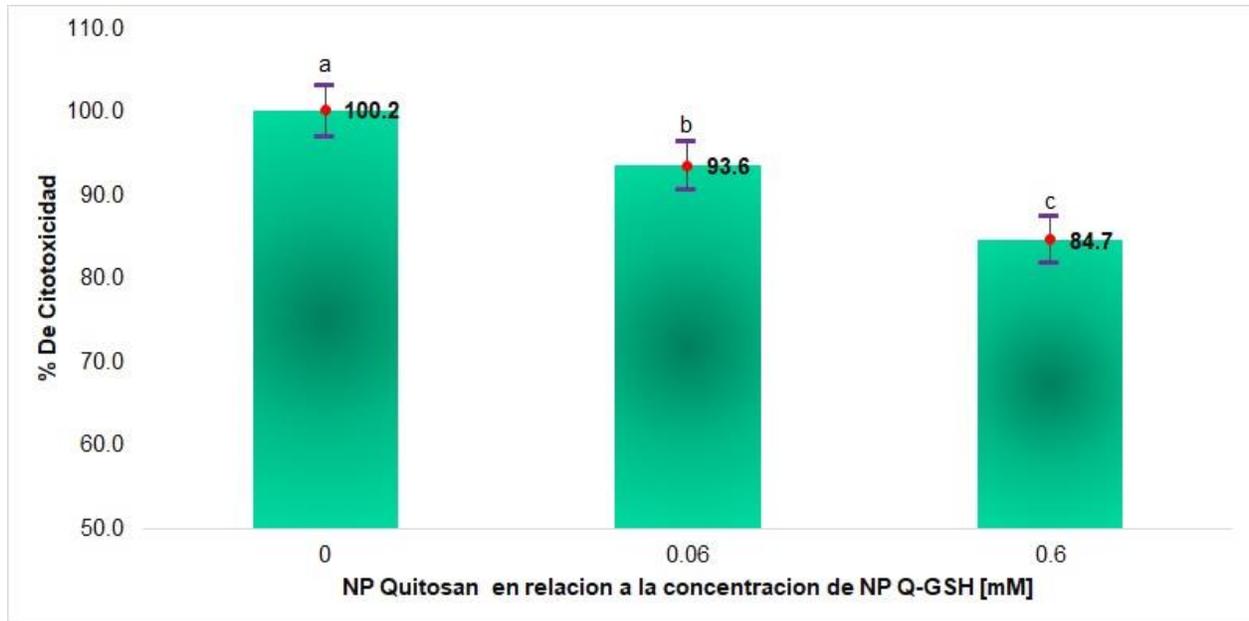


Gráfico 6 Citotoxicidad de cultivo organotípico de hígado de rata Wistar, expuesto a diferentes concentraciones de nanopartículas de Quitosán, por 24 horas de incubación (Promedio de experimentos independientes). Utilizando LSD al 95 % de confianza.

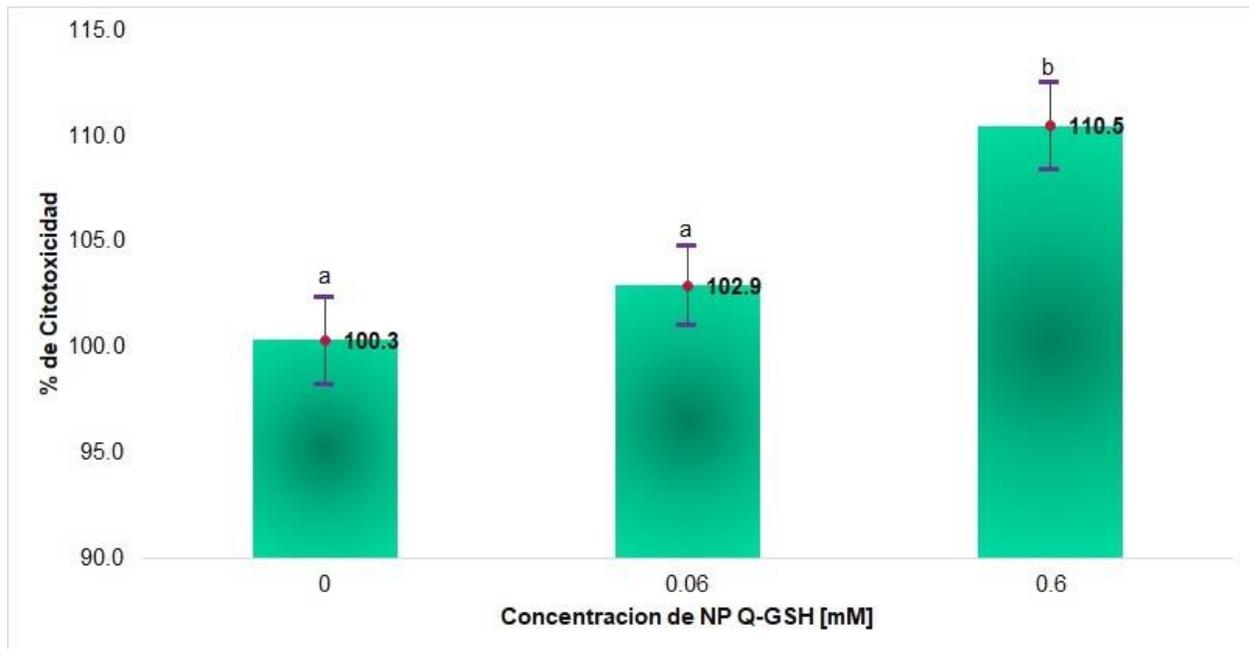


Gráfico 7 Viabilidad de cultivo organotípico de hígado de rata wistar, expuesto a diferentes concentraciones de NP-Q-GSH por 24 horas de incubación (Promedio de experimento independiente). Utilizando LSD al 95 % de confianza.

Para demostrar que las NP-Q y las NP-Q-GSH no son citotóxicas, se realizaron experimentos dosis-efecto para conocer la capacidad citotóxica de ambas nanopartículas, utilizando las concentraciones trabajadas en otros proyectos de investigación dentro del laboratorio 9 de Toxicología celular de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán

En la gráfica 6 se observa que las NP-Q en ambas concentraciones disminuyen considerablemente la viabilidad del cultivo, sin embargo los resultados muestran que la capacidad citotóxica de las nanopartículas no representan un gran impacto en los procesos metabólicos celulares, ya que esta disminución se debe al método de solubilización del Quitosán, recordando que se utiliza un medio ácido (pH 4 -4.5) además de la utilización de un agente entrecruzante como el TPP que puede conllevar ciertos niveles de citotoxicidad, justo como se demuestra en la concentración de 0.6 mM

Pero al observar la gráfica No 7 se aprecia que a pesar de que las NP-Q disminuyen la viabilidad del cultivo, al estar cargadas con GSH estas mejoran notablemente la viabilidad celular, además no hay diferencias significativas entre el grupo control y la concentración de 0.06 mM de NP-Q-GSH. Y demostrando que en la concentración de 0.6 mM el cultivo organotípico demuestra tener una mayor actividad metabólica debido a la cantidad de GSH suministrado, esto sugiere que el glutatión presente en las nanopartículas puede modificar el estado óxido reducción de los cultivos organotípicos en presencia de etanol. Generando una estimación de que estas nanopartículas logran atravesar la membranas celulares, teniendo un rol central en la defensa contra el daño oxidativo causado por el medio ácido y el agente entrecruzante de las NP-Q ^{(44) (88) (94)}

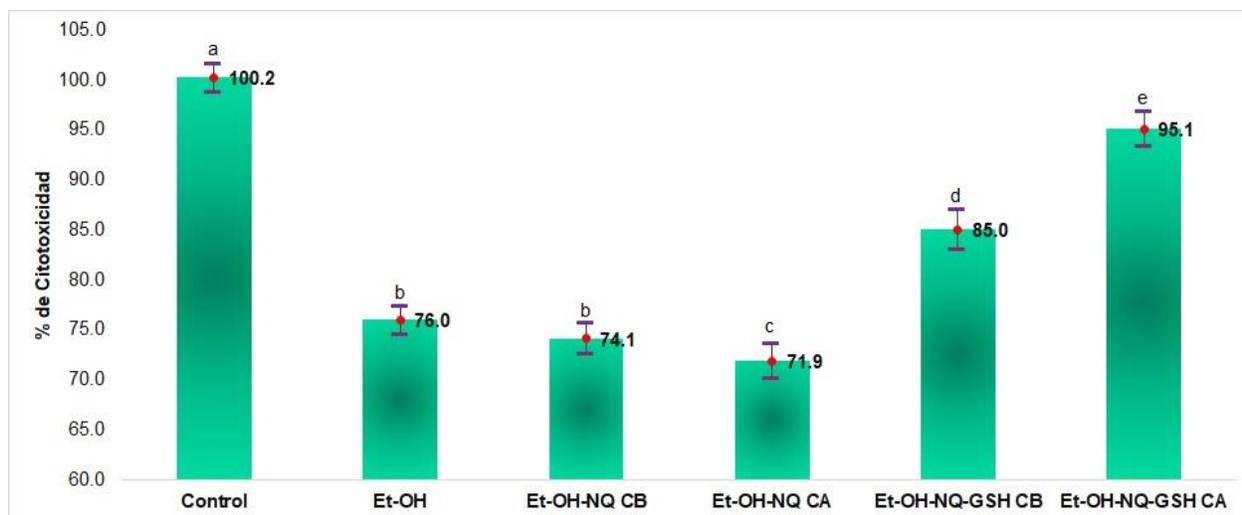


Gráfico 8 Evaluación de la capacidad antioxidante de NP-Q-GSH, expuestos por 24 horas de incubación (Promedio de experimentos independientes). Utilizando LSD al 95 % de confianza.

Una vez demostrado que las Nanopartículas no son citotóxicas, se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante de las NP-Q-GSH. Todos los sistemas a excepción del control negativo, fueron sometidos a la exposición de etanol por 24 h, tiempo suficiente para que sucediera el proceso de biotransformación del etanol y generar estrés oxidativo en el cultivo organotípico hepático.

El proceso de biotransformación del etanol se desarrolla en el hepatocito, y en el existen tres sistemas enzimáticos capaces de oxidar el etanol a Acetaldehído: el sistema de la vía alcohol-deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal oxidativo (CYP2E1) y la vía de la catalasa.

El sistema enzimático de la vía ADH es la principal vía de oxidación del alcohol, en condiciones normales biotransforma cerca del 80-90% del alcohol y se localiza en el citosol de los hepatocitos. La actividad de la ADH se basa en transferir el hidrógeno del sustrato al cofactor NAD^+ , transformándolo en NADH y produciendo acetaldehído. CYP2E1 localizado en el retículo endoplasmático, actúa principalmente cuando se encuentra saturada la capacidad de la ADH y es capaz de oxidar el etanol utilizando NADPH y oxígeno molecular. Su hiperestimulación produce un exceso de radicales libres anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y el consiguiente estrés oxidativo. Se calcula que esta vía contribuye en un 10% en la biotransformación del alcohol. ⁽⁹⁵⁾

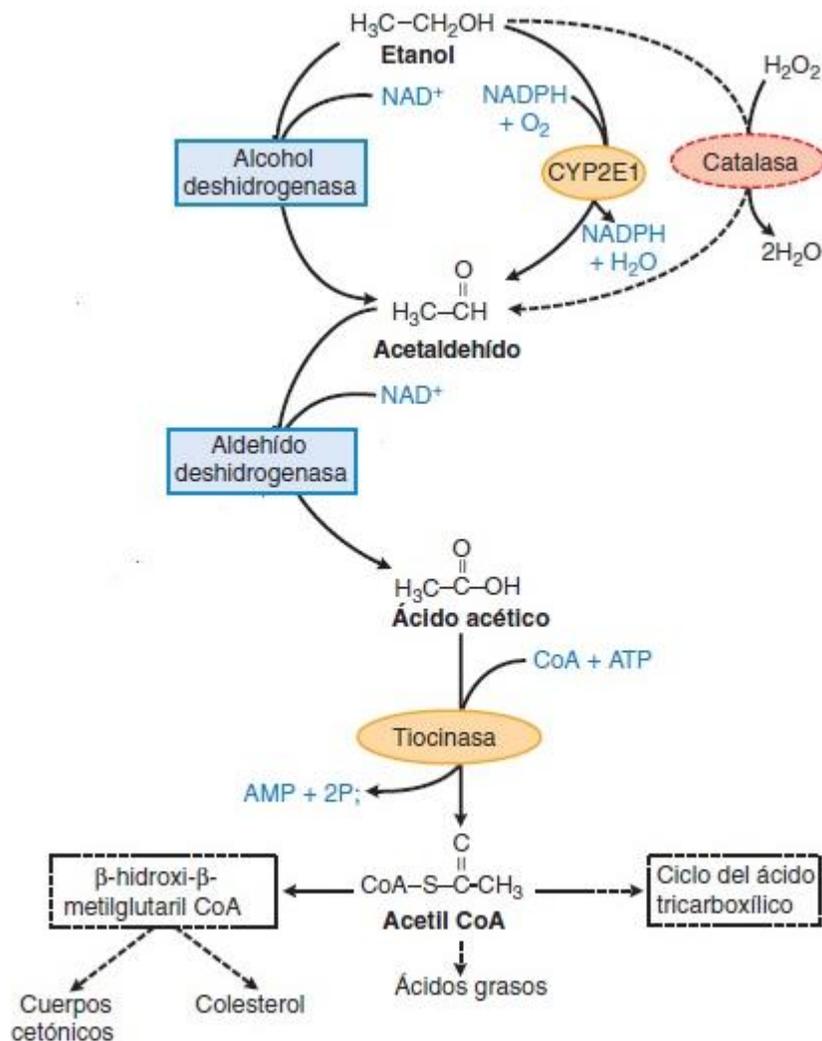


Figura 29 Señalización de la Biotransformación de Etanol ⁽⁹⁶⁾

Si bien el hepatocito es la principal célula que actúa directamente en la biotransformación del etanol, eso no excluye que el etanol tenga actividad sobre otras células hepáticas, es por eso que al estar evaluando la citotoxicidad en un cultivo organotípico, es importante conocer que otras vías pueden ser susceptibles a la exposición a etanol. Por lo que se ha comprobado que las células de Kupffer también pueden ser activadas por la oxidación del etanol mediante CYP2E1, ya que refuerza la activación del factor nuclear β (NF κ B) desencadenando la siguiente cascada de señalización en donde el etanol sobre las células hepáticas, y ejerce una mayor permeabilidad al paso del lipolisacárido (LPS) y se une a una proteína de unión (LBP) y esta última impide la transferencia de LPS en los receptores de membrana CD14 en la célula de Kupffer, por lo que ocurre una translocación de NF κ B, y este induce a la transcripción de citosinas e interleucinas como la IL-1, IL-6 e IL-8, además de que esta translocación también genera la transcripción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) el cual induce apoptosis al hepatocito, y del factor transformante de crecimiento beta (TGF- β) (Figura 30) que es el responsable de la activación de la célula estrellada para la producción de proteínas de matriz extracelular en exceso como colágeno tipo I, lo cual favorece el proceso profibrogénico generando la formación de diversas patologías como hepatitis o cirrosis hepática⁽⁹⁷⁾

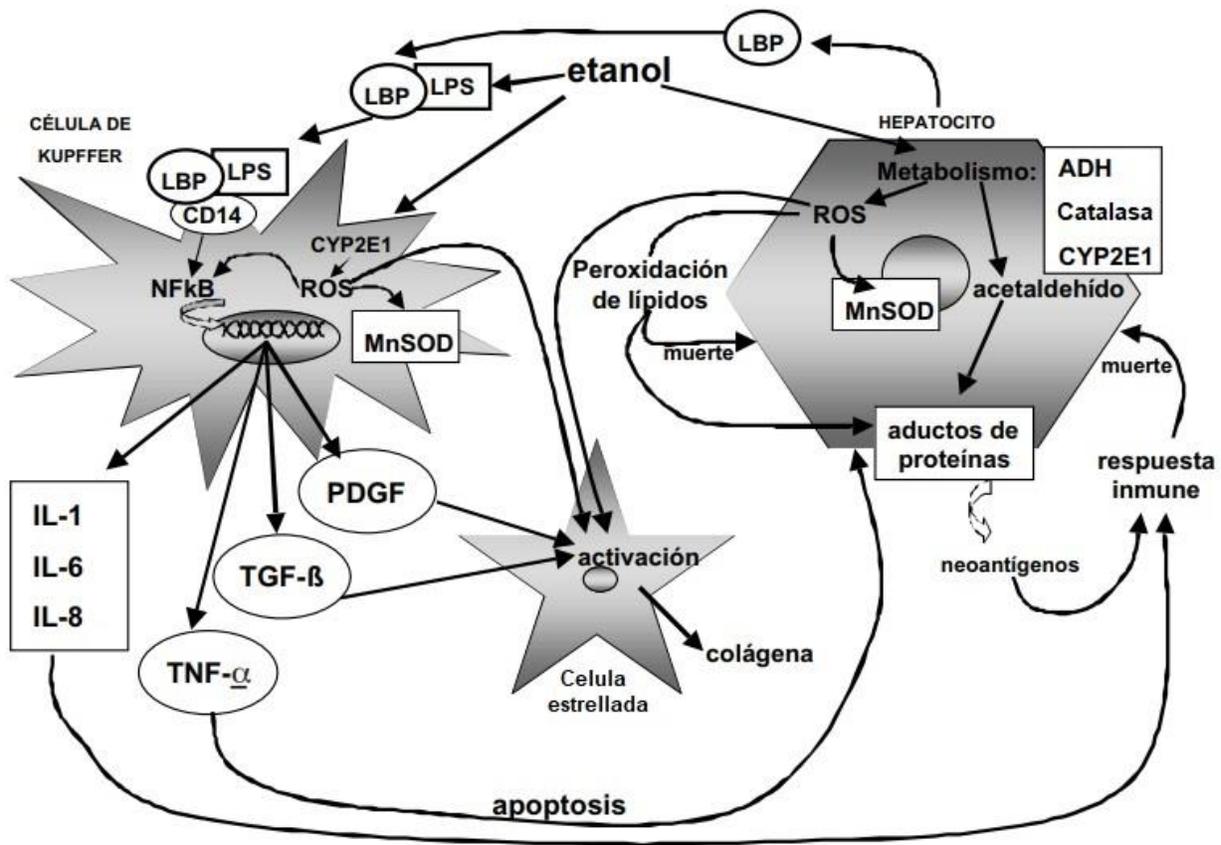


Figura 30 Efecto del etanol sobre células hepáticas ⁽⁹⁷⁾.

De acuerdo a la comunicación celular se planteó la formación de EROs en hepatocitos, CYP2E1 es la fuente más alta de producción de EROs, en casos de intoxicación etílica crónica se tiene un especial alto índice en la actividad de la NADPH oxidasa, permitiendo de este modo la producción de grandes cantidades de radical O_2^- y H_2O_2 .

Es por esto que el gran incremento en la relación NADH:NAD⁺ en el hígado durante la oxidación del etanol tiene consecuencias profundas, además limita la velocidad de la biotransformación del alcohol. Y las enzimas que necesitan NAD⁺ son inhibidas, de este modo se acumula lactato, y aminora la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico y se acumula acetil coenzima A (acetil CoA), que es producida en abundancia a partir del ácido acético derivado del etanol. El incremento combinado de NADH y de acetil CoA estimula la síntesis de ácidos grasos y el almacenamiento y acumulación de triacilglicéridos, surgen cuerpos cetónicos y tal situación exacerba la acidosis láctica. (Figura 29) El metabolismo del etanol por la vía de CYP2E1 genera abundante NADP⁺ y con ello limita la disponibilidad de NADPH para la regeneración de glutatión reducido (GSH), esta disminución de la concentración de GSH va unida a la consecuente disminución de la actividad de la enzima antioxidante Glutathion peroxidasa que a su vez utiliza el GSH como cofactor, lo que favorece la oxidación y producción de EROs lo cual intensifica el estrés oxidativo. ^{(96) (98)}

Al observar el gráfico 8 se aprecia que el control positivo (Et-OH) disminuyó su viabilidad al 76 % indicando la generación de una citotoxicidad que al ser comparada con la columna de NP-Q-CB no existen diferencias significativas, a pesar de que disminuyó un poco la viabilidad esta afecta relativamente en un estado crítico, sin embargo al compararla con la columna de NP-Q-CA se demuestra que presentan diferencias significativas con respecto a la columna de Et-OH ya que la viabilidad celular disminuye, esto sucede porque el cultivo al ser sometido 24 h en etanol sufrió un daño citotóxico del cual no pudo reponerse, ya que posterior a la incubación con alcohol se adicionó una cantidad alta de nanopartículas y como se observó en la gráfica No 6 por la utilización de un medio ácido y del agente entrecruzante como el TPP conlleva a ciertos niveles de citotoxicidad, justificando dicha disminución de viabilidad ⁽⁹⁴⁾

Al observar la columna de NP-Q-GSH CB se demuestra que a concentraciones bajas de GSH, la viabilidad mejoró en un 9% en comparación al control positivo (Et-OH) y en el caso de las NP-Q-GSH CA la viabilidad tuvo un incremento del 19 %, esto indica que con las NP-Q-GSH, los efectos antioxidantes son significativos cuando el cultivo está expuesto a concentraciones altas, liberando el GSH y generando su capacidad antioxidante ante la formación de EROs.

Recordando que el motivo principal del desarrollo de este proyecto de investigación es mejorar la biodisponibilidad del GSH, ya que en gran parte este disminuye por la biotransformación del etanol descrito anteriormente, además de que GSH no es permeable a las células, todo el GSH que se encuentra dentro de las células es sintetizado a partir de sus aminoácidos precursores, por lo que se demuestra que con el desarrollo de NP – Q – GSH permite el paso de GSH al interior de la célula desencadenando su actividad antioxidante ⁽⁸⁹⁾

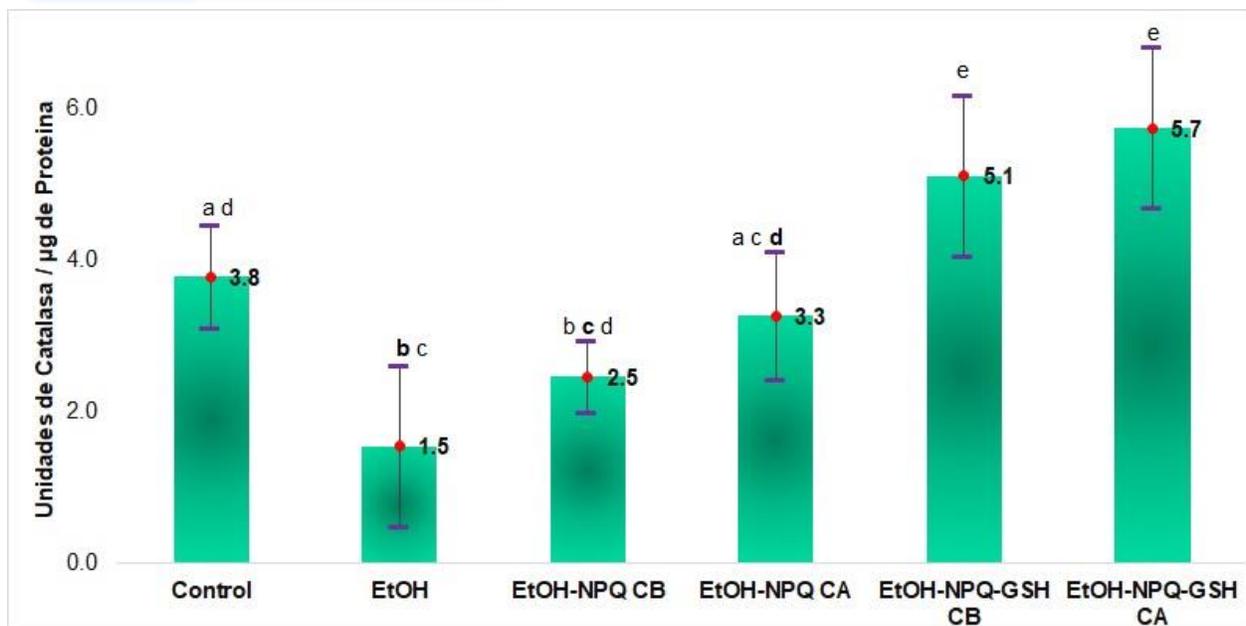


Gráfico 9 Evaluación de la Actividad de Catalasa (Promedio de experimentos independiente). Utilizando LSD al 95 % de confianza.

Cuando hay un exceso de H_2O_2 proveniente de la biotransformación del etanol, este se acumula en la célula y se activa la vía de catalasa, localizada en los peroxisomas, en la que se oxida el etanol usando una molécula de H_2O_2 , por lo que cataliza la dismutación del H_2O_2 en H_2O y O_2^- evitando así que se forme el radical OH^- y el O_2 . En altas concentraciones de H_2O_2 , la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno rápidamente sirviéndose de una reacción catalítica en la cual el H_2O_2 actúa tanto como aceptor, como donador de moléculas de hidrógeno. Generando en su última etapa acetaldehído. ⁽⁸⁴⁾

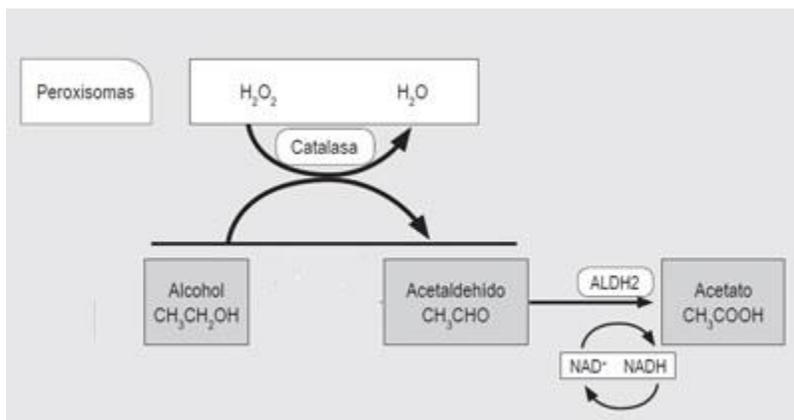


Figura 31 Biotransformación por Vía de catalasa ⁽⁸⁴⁾.

Como se puede observar en la gráfica No 9 el control positivo (Et-OH) no presenta demasiada actividad con respecto al control negativo, y que como se ha explicado con anterioridad, la vía de la catalasa solo se encarga de biotransformar aproximadamente el 10 % del Etanol, por lo que esta disminución podría deberse a que gran parte del etanol se esté biotransformando ya sea por la vía del ADH o CYP2E1, sin embargo al analizar las columnas de Et-OH-NP-Q y Et-OH-NP-Q-GSH se observa un aumento de la actividad de la catalasa, probablemente esto sucedió por el aumento de la cantidad de GSH, lo que generó que el sustrato H_2O_2 no se encuentre saturado

ya que este peróxido de hidrógeno formado durante el metabolismo aeróbico también es metabolizado por GSH formando Glutación oxidado (GSSG) por la acción de la enzima glutación peroxidasa, tanto en el citosol como en la mitocondria, lo que demuestra que la catalasa que está ausente en la mitocondria se encarga de metabolizar una parte de este H₂O₂, lo que explica el incremento de la actividad de catalasa. ^{(81) (86) (98) (99)}

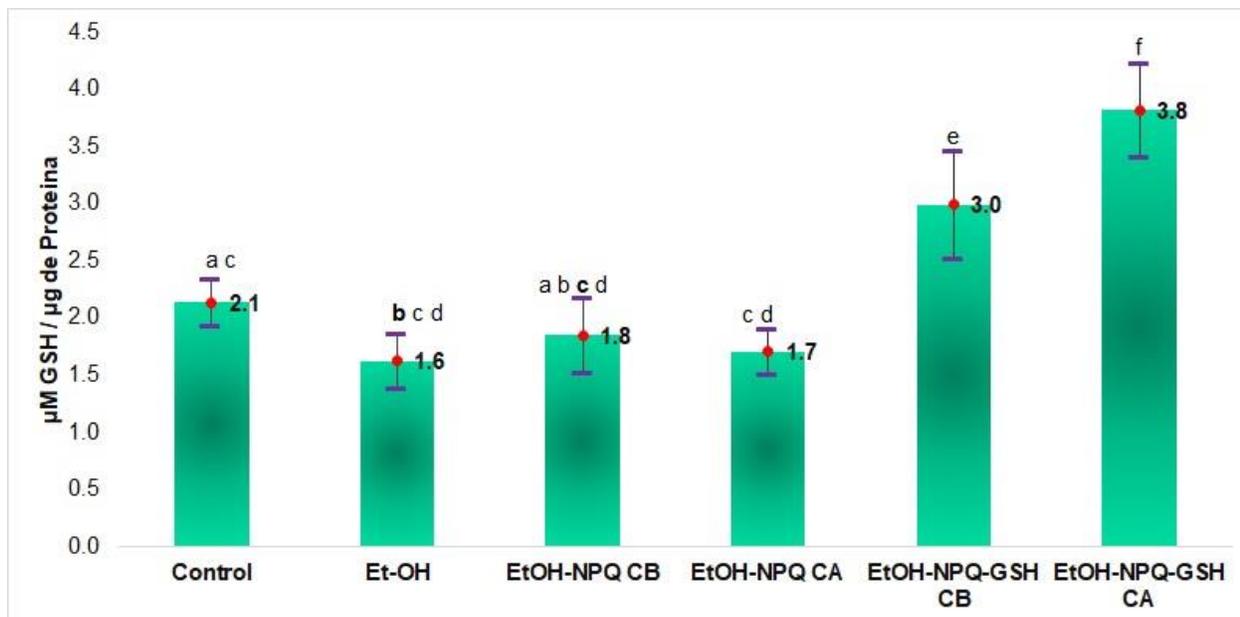


Gráfico 10 Evaluación de la Actividad de GSH (Promedio de experimentos independiente). Utilizando LSD al 95 % de confianza

De acuerdo al gráfico 10 se observa que prácticamente no hay diferencias significativas entre las columnas de Et-OH, Et-OH-NQ-CB y Et-OH-NQ-CA con respecto al control negativo, esto sucede porque los niveles hepáticos de GSH se agotan 6 horas después de la intoxicación de Etanol en animales jóvenes, (recordando que se utilizaron ratas wistar de aproximadamente 4 semanas de edad) y como ya se explicó la biotransformación del etanol por la vía de CYP2E1 genera abundante NADP⁺ y con ello limita la disponibilidad de NADPH para la regeneración GSH, esta disminución de la concentración de GSH va unida a la consecuente disminución de la actividad de la enzima antioxidante Glutación peroxidasa que a su vez utiliza el GSH como cofactor, lo que favorece la oxidación y producción de EROs lo cual intensifica el estrés oxidativo. Así mismo ocurre un mecanismo de agotamiento de GSH inducido por EtOH el cual puede implicar la conjugación directa de GSH con el acetaldehído, (primer producto de la biotransformación del etanol), y esta unión se da específicamente en la cisteína, eliminando así el GSH activo de las células del hígado. Los niveles reducidos de GSH alteran el estado redox de la célula al disminuir la relación GSH / GSSG y / o aumentar la formación de EROS. ^{(100) (101)}

En el gráfico No 10 en la columna de ET-OH-NQ-GSH-CB y ET-OH-NQ-GSH-CA se muestra un incremento en la cantidad de GSH con respecto a todos los tratamientos, por lo que se demuestra que se evita el agotamiento de los niveles de GSH por etanol, además de que haciendo una relación con la gráfica No. 8 se observa que en estas columnas, la viabilidad del cultivo aumento, lo que indica que la Cantidad de GSH ingresada a través de las nanopartículas es suficiente para poder realizar su capacidad antioxidante. Recordando que la presencia del grupo sulfhidriilo del residuo de cisteína es altamente reactivo, facilitando la participación de GSH en una gran variedad de funciones antioxidantes. ⁽⁸⁶⁾

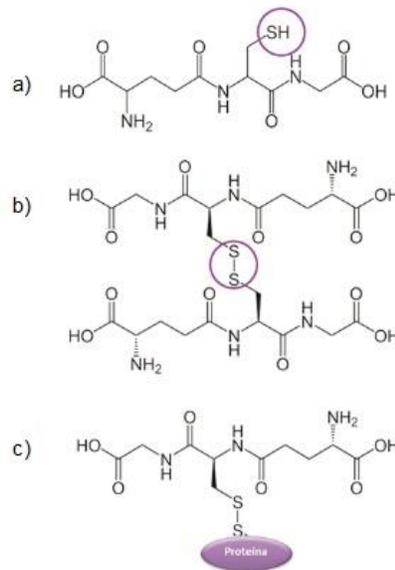


Figura 32 Estructuras de GSH a) GlutatiÓn reducido (GSH), su grupo activo es el grupo SH del residuo de Cisteína (círculo). b) GlutatiÓn oxidado, formado por dos molÉculas de GSH unidas por un enlace disulfuro (círculo). (GSSG). c) GlutatiÓn unido a proteínas.⁽⁸⁶⁾

Por lo que los radicales libres formados por la biotransformación del etanol se inactivan por el GSH por la acción de la enzima glutatiÓn peroxidasa, tanto en el citosol como en la mitocondria formando conjugados para luego ser excretados en la billis bajo la forma de derivados de ácidos mercaptúricos. Además también se forma GSSG el cual luego es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando así un ciclo de óxido-reducción. En condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de la célula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, GSSG es activamente transportado fuera de la célula o bien reacciona con los sulfhídricos de las proteínas para formar disulfuros mixtos (PSSH).^{(86) (91) (100)}

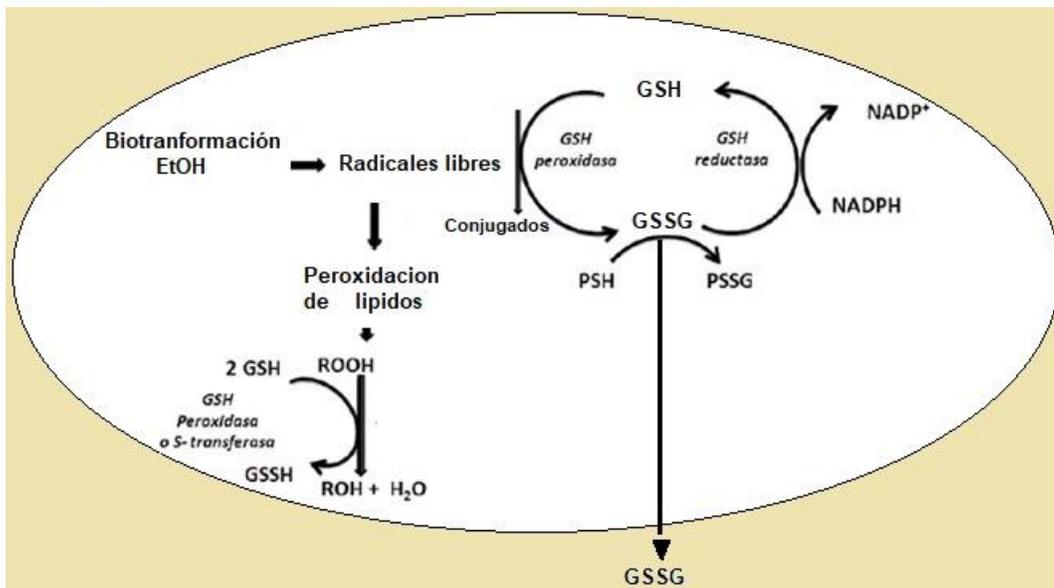


Figura 33 Acción del GSH sobre la biotransformación de Etanol

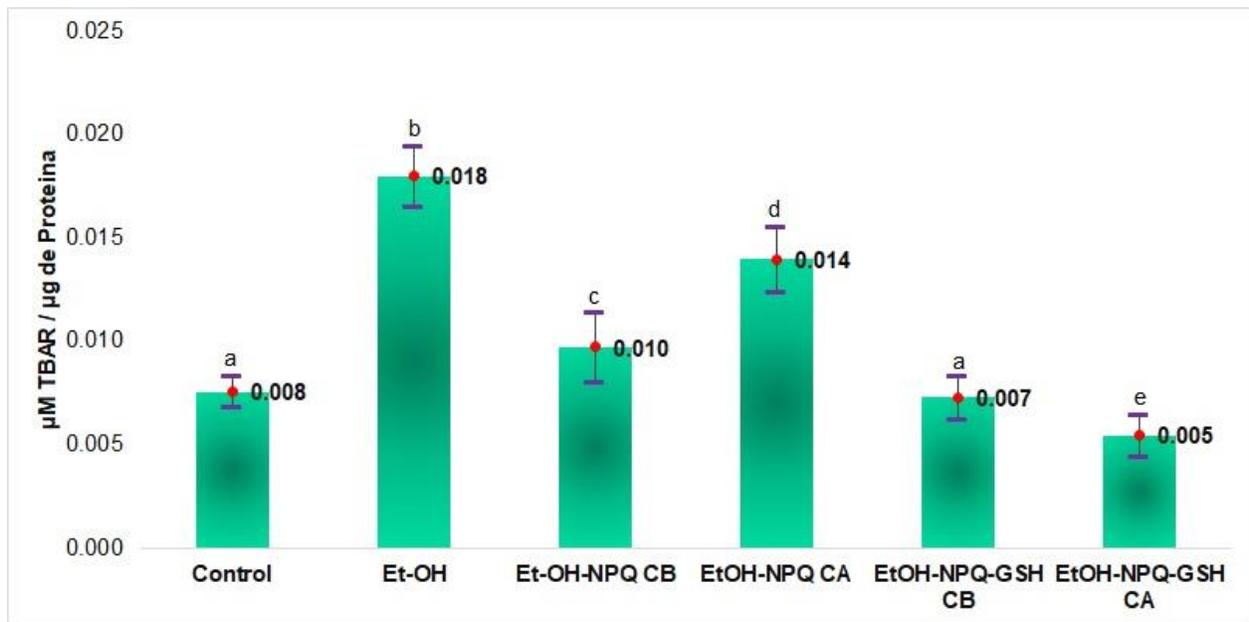


Gráfico 11 Evaluación de la Actividad de TBAR (Promedio de experimentos independiente). Utilizando LSD al 95 % de confianza.

Al analizar el gráfico 11 se observa que en las columnas de Et-OH-NPQ-CB, Et-OH-NQ CA y Et-OH hay un incremento en la cantidad de TBAR con respecto al control negativo, ya que las Nanopartículas de Quitosán generan un cierto daño a la membrana celular por las condiciones del medio ácido en el que son preparadas además de que el incremento de TBAR también se justifica por que las EROs generadas por la biotransformación de etanol en el hepatocito, provoca la peroxidación de lípidos de membrana y enseguida, el radical libre lipídico sufre la adición de oxígeno para formar un hidroperóxido de lípido y luego descomponerse llevando al hepatocito a la muerte. Los peróxidos orgánicos (ROOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la glutatión peroxidasa o la enzima GSHT-transferasa. Por lo que se podrían formar aductos de proteínas con el acetaldehído proveniente directamente de la biotransformación del etanol y también con

otros aldehídos reactivos formados en la descomposición de los peróxidos de lípidos. La descomposición de los hidroperóxidos da lugar a la formación de aldehídos reactivos, tales como el malondialdehído (MDA) y el 4- hidroxinonenal (4-HNE). El acetaldehído proveniente directamente del metabolismo del etanol, constituye también una sustancia tóxica para el hepatocito, ya que forma aductos de proteínas, que junto con el MDA y el 4-HNE, son reconocidos como neoantígenos. Los aductos de proteínas se forman a través de enlaces covalentes entre las cadenas laterales de las proteínas y la sustancia reactiva, en este caso acetaldehído, MDA y 4HNE. Las proteínas identificadas como aductos incluyen a la tubulina, las lipoproteínas de baja densidad, y otras proteínas de membrana del hepatocito. Además de promover la respuesta inmune, los aductos de proteínas no son funcionales, y hacen que disminuya la secreción de ellas debido a su cambio conformacional, haciendo que el hepatocito adquiera un aspecto redondeado de tamaño aumentado, concomitante a la acumulación de lípidos. ^{(97) (100)}

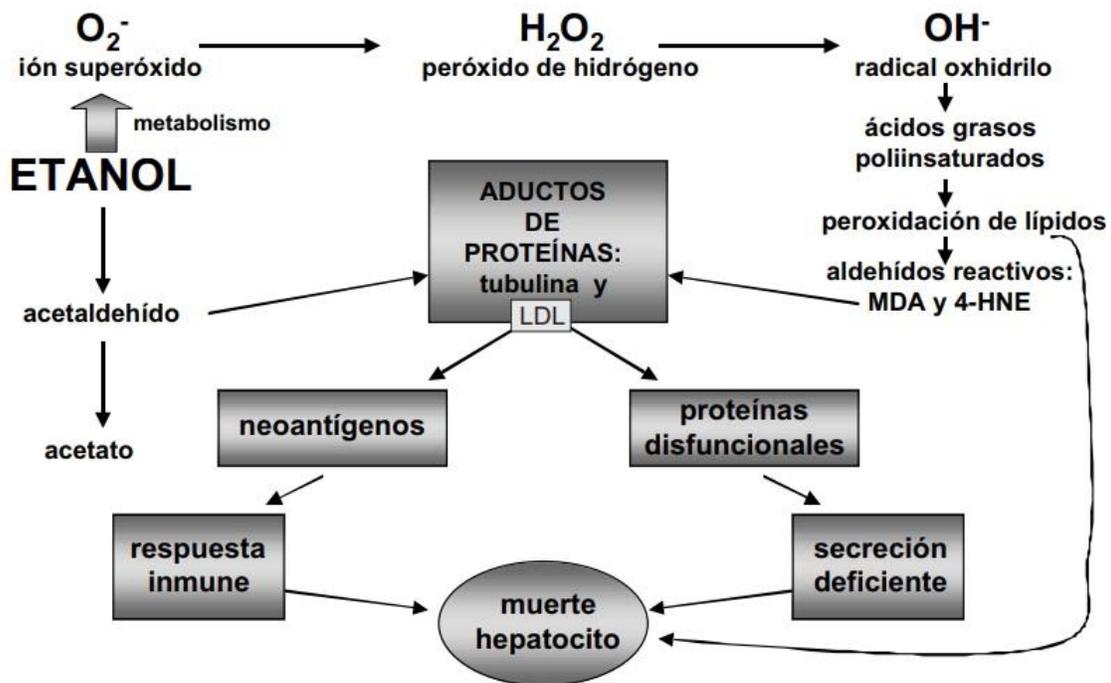


Figura 34 Aduptos de proteínas ⁽⁹⁷⁾

Mientras que en la columna Et-OH-NQ-GSH-CB del Grafico 11 se observa que no hay diferencias significativas con respecto al control negativo y en Et-OH-NQ-GSH-CA se aprecia que el valor de TBAR es menor, por lo que se demuestra que con las NP-Q-GSH disminuye la presencia de peroxidación de lípidos de membrana, ya que las EROs generadas por el etanol, están siendo conjugadas con el GSH, y esto provoca que no exista la formación de hidroperóxidos, por lo tanto también se previene la formación de aductos con las proteínas y aldehídos reactivos, correlacionando con la gráfica No 10 se confirma que el GSH dentro de las nanopartículas es suficiente para prevenir la peroxidación por lo que tiene sentido lo expresado en el gráfico 8 ya que al prevenir la formación de peróxidos y su descomposición, se mejora la viabilidad del cultivo organotípico. ^{(97) (98)}

32 Conclusiones

Se demostró que con la utilización de Nanopartículas de Quitosan al encapsularlas con GSH se mejora la biodisponibilidad de este antioxidante, ya que este no puede ingresar a la célula por sí solo. Es por esto que para evaluar la capacidad antioxidante se utilizaron cultivos organotípicos de hígado de rata, que permiten realizar estudios de citotoxicidad, con mayor precisión ya que estos tejidos guardan toda la estructura así como su comunicación celular, lo que es ideal para evaluar las vías de señalización celular que se activan con respecto a diferentes estímulos.

Se utilizó Etanol como agente xenobiotico el cual se determinó que a una concentración de 100 Mm la viabilidad celular se encuentra aproximadamente en un valor del 75 % siendo un gran citotóxico hepático que a través de sus diferentes vías de biotransformación desencadena EROs que son causantes del estrés oxidativo celular y esto produce diversas patologías causadas por el aumento de EROs.

Se comprobó que las propiedades de las nanopartículas elaboradas, como porcentaje de encapsulación y dispersión dinámica de la luz corresponden a un buen método de encapsulación de GSH por la técnica de gelación ionotrópica, ya que a pesar de la polidispersión del tamaño de partícula, se demostró que el GSH se encapsulo, por lo que una vez administradas las nanopartículas de Quitosán – GSH posteriores a la exposición de etanol, se mejoró la viabilidad celular, lo que es indicativo de que las nanopartículas entran a las células liberando el GSH y desencadenando su actividad antioxidante

Se demostró que la vía de catalasa se activa con mayor potencia cuando se administra GSH, ya que al no encontrarse saturado el sustrato H_2O_2 puede compartir este con GSH para poder biotransformar el etanol. En cuestión de GSH y TBARS guarda una estrecha relación ya que en la primera se ve una disminución de GSH en los tratamientos con Etanol y con Et-OH-NP-Q ya que el etanol genera la disminución de GSH por lo que el aumento de las EROs desencadena problemas de peroxidación de lípidos de membrana así como su posible descomposición de los hidroperóxidos generando la posible formación de aductos, por lo que esto se ve reflejado en las pruebas de TBARS en donde se ve claramente que la peroxidación de lípidos esta aumentada en los tratamientos con Etanol y con Et-OH-NP-Q. Mientras que con Etanol y con NP-Q –GSH, el aumento de GSH mejora la viabilidad celular así como prevenir la peroxidación de lípidos de membrana.

Se acepta que las nanopartículas mejoraron la biodisponibilidad del GSH ante el estrés oxidativo provocado por etanol, sin embargo se deben de realizar pruebas específicas para comprobar la efectividad del efecto antioxidante de las nanopartículas de Quitosán con glutatión

33 Perspectivas

Para poder hacer una correlación más específica se sugiere realizar otras pruebas enzimáticas como ADL, CYP2E1, así como GPX, especies reactivas de oxígeno y pruebas de funcionamiento hepático además de realizar estudios de microscopia para comprobar que las nanopartículas ingresan dentro del espacio intracelular.

34 Referencias Bibliográficas

1. Mejías Y, Cabrera N, Toledo AM, Duany OJ. (2009) Nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Rev Cub Salud Pub* V35 (3)
2. Beier JI, McClain CJ. (2010) Mecanismos y señalización celular en hepatopatía alcohólica. *Biol. Chem.* ; 391 : 1249-1264. doi: 10.1515 / bc.2010.137. [[Artículo gratuito dePMC](#)] [[PubMed](#)]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755482/>
3. Nordmann R, Ribière C, Rouach H. (1992) Implicación de los mecanismos de radicales libres en la lesión celular inducida por el etanol. *Gratis Radic Biol Med.* 12 (3): 219 - 240. [[PubMed](#)]
4. Das SK, Vasudevan D. (2007) El estrés oxidativo inducido por el alcohol. *Life Sci.* ; 81 (3): 177 - 187. [[PubMed](#)]
5. Sen CK. (1999) Homeostasis de glutatión en respuesta al entrenamiento físico y suplementos nutricionales. *Bioquímica Molecular y Celular.* 196 : 31-42. doi: 10.1023 / A: 1006910011048. [[PubMed](#)]
6. Quintana Ruiz, Mildred *et al.* (2008) "Nanopartículas: principios y aplicaciones". *Revista Ciencia y Desarrollo*, Julio, Vol. 34, no. 221, p. 62-67. Versión electrónica Norma ISO 690-2
7. Franks A. (1987) "Nanotechnology", *Journal of Physics E: Scientific Instrumentation* 20, pp 1442-1451.
8. Amalio Serena P. (S/A) Nanociencia y nanotecnología: aspectos generales Domingo Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid Consejo Superior de Investigaciones Científicas U.A.M
9. Webster Thomas J. (2007). ¡El segundo año de IJN ahora es parte de la historia de la nanomedicina! *Int J Nanomedicina* . 2007 Mar; 2 (1): 1-2. Publicado en línea el 2007 Mar. PMID: PMC2673819
10. Robert A. Freitas Jr. (2006). Nanomedicina. Foresight Institute [En línea]. <https://foresight.org/Nanomedicine/#Welcome>
11. Martínez de la Fuente J. (2014) La revolución de la nanotecnología en la medicina del futuro, Instituto de Nanociencia de Aragón (Universidad de Zaragoza)
12. Tabero A, Weng-Jiang X, Martínez de Pinillos A. (2018) Nanoterapias en el campo de la Biomedicina, Sociedad Española de bioquímica y biología Molecular, *Revista de Nanomedicina*, Madrid España.
13. Goldberg M, Langer R, Jia X. (2007) Materiales nanoestructurados para aplicaciones en la entrega de fármacos y la ingeniería de tejidos. *J Biomat Sci.*; 18: 241-68
14. Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa (2008). Nanofármacos emergentes. *Nanomed Nanotech Biol Med.*; 4: 273-282.
15. Ahmed N, Fessi H, Elaissari A. (2012) Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discov Today* 17 928-34.
16. Mohanraj, V. J. & Y Chen (2006). Nanoparticles- A Review *Tropical journal of pharmaceutical Research* 561-573
17. Álvarez JD, Hernández C, Cataño JG. (2008). Nanotecnología, avances y expectativas en urología. *Urol colomb.*;18:41-8
18. Bei, D., Meng, J., & Youan C, B.-B. (2011.). *Medscape news*. Retrieved 10-Octubre from *Engineering Nanomedicines for improved Melanoma Therapy*.
19. Sahoo SK, Labhasetwar V. (2003) Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Disc Today*.;8:1112-20.
20. Jaimes , Sara, González, Alisia , Granados, Carolina, Álvarez, David , Espitia, Erick (2012). Nanotecnología: avances y expectativas en cirugía *Rev Colomb Cir.* 2012;27:158-166

21. Medical Subject Headings (MeSH) Database. Fecha de consulta: 1 de abril de 2011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68008081>
22. Emerich DF, Thanos CG. Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis. *Journal of Drug Targeting*. 2007;15:163- 83
23. Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, et al. (2002). Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*. 2002;21:41-6.
24. Atking Justing (2016). Una excursión por el mundo de la nanotecnología - Parte 1; Quantum dots. Medium [En línea]. <https://medium.com/@justinatkin/a-jaunt-through-the-world-of-nanotechnology-part-1-quantum-dots-c3107d6c697c>
25. Alonso Garrido Beatriz, Casado Santana, Carmen M. (S/A) Dendrímeros: Macromoléculas versátiles con Interés interdisciplinar. Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid
26. Baughman RH, Zakhidov AA, de Heer WA. (2002). Carbon nanotubes –the route toward applications. *Science*. 2002;297:787-92
27. Maubert , M, Soto S , L. León C , A. Flores, J. (S/A) Nanotubos de carbono – La era de la nanotecnología Área de Química de Materiales, Universidad Autónoma Metropolitana
28. Espinosa Andrews H; García Márquez E. (2017). Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos. *NanoBio*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. ISBN: 978-607-97548-3-9
29. Leong, T. S. H.; Wooster, T. J.; Kentish, S. E.; (2009). Ashokkumar, M. Minimising Oil Droplet Size Using Ultrasonic Emulsification. *Ultrason. Sonochem.*, 16, 721–727.
30. Lancheros R. J., Beleño J. A. , Guerrero Carlos A, Godoy-Silva R. D. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC) *Univ. Sci*. 2014, Vol. 19 (2): 161-168 doi: 10.11144/Javeriana.SC19-2.pnpm
31. Llabot J. D; Palma S. Allemandi D. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas [En línea] Obtenido de URL: https://www.researchgate.net/publication/236679562_Nanoparticulas_polimericas_solida_s Consultado el día 21 de Julio 2018
32. Goycoolea F. M., Remuñán-López C., Alonso M. J. (S/A) Nanopartículas a base de polisacáridos quitosano Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. Laboratorio de Biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, México.
33. Centeno Sánchez R. L. (2008). Nanometrología: Soporte de la Nueva Revolución Industrial. University of Cambridge Pembroke Street, CB2 3QZ, Cambridge, Reino Unido.
34. Malvern Panlytical Dispersión de luz dinámica. [En línea]. Obtenido de URL: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering/> Consultado el día. 22 de Julio de 2018.
35. Günther Crollly (2018). Dispersión de Luz dinámica (DLS) Fritsch GmbH - Milling and Sizing
36. Frank B. (2016) ¿Cómo podemos fotografiar el mundo en la nanoescala? *Nano Sostenible*. Blog original en inglés. [En línea] obtenido de <http://nano-sostenible.com/2016/05/04/fotografiar-la-nanoescala/>. Consultado el día 22 de Julio de 2018.
37. Batalla Mayoral J., Cuadros Moreno A., San Martín-Martínez E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional.
38. Lyklema, J. H., (1991). *Fundamentals of interface and colloid science*. Academic Press. London

39. Sandoval Yoal L., Montellano Palacios, L. Piña Soberanis M. y Sánchez Guzmán L.A. (S/A). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
40. Fito López. C. (2014). Nanotecnología y efectos adversos en la salud: Nanotoxicología. ITENE. Jornada de Nanotecnología y prevención de riesgos Nuevos desarrollos en la evaluación y control de la exposición laboral a NMs: Experiencias en el marco del proyecto LIFE NanoRISK
41. Bernard A, Lauwerys R (1986). Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J Occup Med* 28: 559.
42. Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diepgen T.L. (1988). The human serum paraoxonase-polymorphism and specificity. *Toxicol Environ Chem* 18: 79-196.
43. Arencibia Arrebola D.F., Rosario Fernández L.F., Curveco Sánchez D.L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel Centro de Química Farmacéutica (CQF). Ciudad de La Habana, Cuba.
44. Constanza Corrales L. , Muñoz Ariza M.M. (2012) Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá, D.C., Colombia.
45. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., & Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, 65, 1865–1874.
46. Fernández, JM., Da Silva-Grigoletto ME., Túnez-Fiñana I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deporte* 2009;2:19-34 Vol. 2. Núm. 1. Marzo 2009
47. Cheeseman K, Slater T. (1993). An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman K, Slater T, editors. *Free radicals in medicine*. London (UK): Churchill Livingstone; 481 – 493.
48. Pérez Gastell, P.L. , Pérez de Alejo J.L. (2000) Métodos para medir el daño oxidativo Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto" *Rev Cubana Med Milit* 29(3):1928
49. Lowe F (2014) Biomarkers of oxidative stress. In: Leher (ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, pp 65-87
50. Halliwell B, Gutteridge JM (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Midsomer Norton, Avon, England: Oxford University Press
51. Morgan Martins M. (2003) Reposição de estrogênio Dimui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas. PPG em ciencias biológicas. Fisiología. Volume Tese de Doutorados. Porto Alegre (Brasil). UFRGS.
52. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY
53. Esterbauer H (1996) Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol Biol* 44: 25–28.
54. Flores Jiménez, Víctor (2011). Prueba de del Ácido Tiobarbitúrico (TBA). Obtenido de Rancidez oxidativa en lípidos [En línea] URL: <https://sites.google.com/site/rancidezoxidativaenlipidos1/home/prueba-de-del-acido-tiobarbiturico-tba> Consultado el día 26 de Julio de 2018.
55. Londoño Londoño J. (S/A). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingenierías, Corporación Universitaria Lasallista. [En línea] Obtenido de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf> consultado el día 26 de julio de 2018.
56. Wood-Duque, M. Hernández-Caso, N. Delgado-Martínez, I. Montañez-Valdez, M. Sánchez-García J.C. (2014). Validación del método de Ellman para la determinación de

- la concentración de grupos sulfhidrilosa muestras de la producción de la vacuna sintética contra el *Haemophilus influenzae* tipo b . *Vaccimonitor* vol.23 no.2 Ciudad de la Habana Mayo.-ago. 2014
57. Wilfredo Mañón R., Garrido G. Núñez Sellés, A. J. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2), 62-83 ISSN 0719-4250
 58. Martínez-Torres, A.C., Uscanga-Palomeque, A.C., & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. En RivasMorales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 269-312
 59. Borella M, Varela Q. (2004). Antioxidantes enzimáticos. En: *Radicaís libres e a resposata celular ao estresse oxidativo*. Editora da ULBRA. Canoas- RS (Brasil). 2004: 35 – 49.
 60. Arthur J. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.*; 57: 1825 – 1835
 61. Bandyopadhyay U. Das D, Banerjee R. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.*; 77: 658 – 666.
 62. Power S, Lennon S. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.*; 58: 1025 – 1033.
 63. Pietrasanta, L., Von Bilderling, C. (2011). Tópicos en Biofísica Molecular [En línea] Obtenido de http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_lab04.pdf
 64. Lysbeth B. (S/A) Aspectos básicos sobre el manejo y preservación de los cultivos celulares. Departamento de cultivo celular. Instituto nacional de higiene Rafael Rangel
 65. Manarin., (2018). Tipos de cultivos celulares Generalidades Curso “Introducción al Cultivo de Células Eucariotas” [En línea] obtenido de http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/153753/mod_resource/content/1/clase%20curso%20cultivos%20celulares%20-%20ROMINA%20MANARIN%202018.pdf consultado el día 26 de Julio de 2018.
 66. Riascos, D., Guzmán, F., Buritica, E. , Palacios, M., Escobar, M.I. , Pimienta, H. (2008). Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico. *Colombia Médica* Vol. 39 N° 3 (Supl 3), (Julio-Septiembre)
 67. Möller Bredo, R., Vazquez Odon, N. (2011) Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*) *Int. J. Morphol.* vol.29 no.1 Temuco mar.
 68. Blanc JF, Lepreux S, Balaboud C. (2002). Histophysiologie Hépatique. *Encycl Méd Chir. Elsevier, Paris, Hépatologie 7-005-A-10, 13pp*
 69. Ishii, Y., Nurrochmad, A. and Yamada, H. (2010) Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by endogenous compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.* 25(2):134-48
 70. Segarra, E. E. (2006) Fisiología de los aparatos y sistemas. Capítulo 11. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Cuenca.
 71. Nguyen, D. et al. (2014) Effect of increasing glutathione with cysteine and glycine supplementation on mitochondrial fuel oxidation, insulin sensitivity, and body composition in older HIV-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan; 99(1): 169-77
 72. Diamond, A. M. (2015) The Subcellular Location of Selenoproteins and the Impact on Their Function. *Nutrients*, 7, 3938-3948. 11. Ribas, V. et al. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*. Volume 5, Article 151.
 73. Zouhair, F. S. et al. (1987) Taurine Enhances Low Density Lipoprotein Binding. Internalization and degradation by cultured Hep G2 cells. *J Biol Chem.* Vol. 262, No. 13, pp. 6069-6073.
 74. Madrigal, E. et al. (2014) Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastroenterol.* 20 (40): 14787-14804. [SEP]17. Obeid, R. (2013) The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway

75. Arce, P. (2016). A propósito del hígado. Hígado (detoxificación y depuración hepática). [En línea] Obtenido de Complementos Nutricionales Nutilab URL: <http://nutilab-dha.com/higado-detoxicacion-y-depuracion-hepatica/> Consultado el 27 de Julio de 2018
76. PUBCHEM ETANOL
77. Riveros Rosas H., Julian Sanchez A. (S/A). Mecanismos de toxicidad del etanol. Depto. Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM). Mexico
78. Velasco Martin. A. (2014). Farmacología y toxicología del alcohol etílico, o etanol. *An Real Acad Med Cir Vall* 2014; 51:242-248.
79. Ladero Quesada JM. "Alcohol (I). (1998). Farmacología del alcohol. Intoxicación aguda". En: *Drogodependencias*. Lorenzo, Ladero. Leza, Lizasoain. Madrid Edit. Médica Panamericana SA 1998;233-248
80. Cuellas Arroyo, J. A. (2007). Farmacología del Alcohol y sus Interacciones. [En línea]. Obtenido de <http://www.fisac.org.mx/investigaciones.cfm?investigacion=207> Consultado el día 28 de Julio de 2018.
81. Aragón, C.; Miquel, M.; Correa, M.; Sanchis-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. Universitat Jaume I. Area de Psicobiología. Campus de Borriol. 8029 AP Castelló.
82. Kitson KE, Weiner H. (1996) Ethanol and acetaldehyde metabolism: Past, present and future. *Alcohol Clin Exp Res*; 20: 82A 2^a
83. Lieber CS, DeCarli LM. (1970). Hepatic microsomal ethanol-oxidating system. In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *J Biol Chem* 1970; 245: 2505—12
84. Berkaloff A, Bourguet J, Favard P, Lacroix J. (1988). Biología y fisiología celular: Cloroplastos, peroxisomas, división celular. Ed. Omega. Barcelona,.
85. Lieber CS Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997; 257: 59—4
86. Denzoin Vulcano L. A., Soracia, A.L. Tapia, M.O. (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta bioquím. clín. latinoam.* vol.47 no.3 La Plata set.
87. Glutathion Biblioteca Nacional de Medicina de los estados Unidos. Centro Nacional de información biotecnológica. [En línea] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glutathione> consultado el día 20 mayo de 2019
88. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003) Analyses of Glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*; 333 (1): 19-39
89. Yang H, Ierapetritou MG, Roth CM. (2010). Effects of amino acid transport limitations on cultured hepatocytes. *Bio-phys Chem*; 152 (1-3): 89-98
90. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K (1999) Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59: 198–204.
91. Lu SC. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*; 30 (1-2): 42-59.
92. Thermofisher. DTNB (Ellman's Reagent) (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) [en línea] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22582> consultado el día 20 mayo de 2019
93. Probiotek (S/A). Ensayo de viabilidad celular de Resazurina. [En línea] <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/colorantes/resazurin-cell-viability-assay-kit/> consultado el día 20 de mayo de 2019.
94. Alvarez-Barreto J. , Márquez K. (2017). Cultivo de Células Madre Mesenquimales Sobre Hidrogeles Compuestos de Nanopartículas de Hidroxiapatita y Quitosano Foto-Entrecruzable. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*. Vol. 38 | No. 3 | septiembre - diciembre 2017 | pp 524-536. Consultado el día 20 de Mayo de 2019.
95. Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J. (2014). Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Med Interna Mex*. 2014; 30(3):295–308

-
96. Chabner B. Knollman B. (2012). Etanol y metanol. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill 12 ed.
 97. Bastidas Ramírez B. E. Delgado Rizo V. (2005). Predisposición genética a daño hepático por alcohol. Medigraphic. Vol. VII • Marzo 2005
 98. Sánchez de la Campa Valero, L. (2017). Estudio comparativo del estrés oxidativo generado por el consumo de alcohol. El ácido fólico como terapia. Universidad de Sevilla [En línea]
<https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/64907/Estudio%20comparativo.pdf?sequence=1&isAllowed=y> consultado el día 21 de mayo de 2019.
 99. Díaz A. (SA) La estructura de las catalasas. REB 22 (2): 76-84- [En línea].
[http://www.uacj.mx/ICB/redcib/Documents/REB_DOC/2003/06/2003-2_LA%20ESTRUC .pdf](http://www.uacj.mx/ICB/redcib/Documents/REB_DOC/2003/06/2003-2_LA%20ESTRUC.pdf)
 100. Barbara L. Vogt y John P. Richie, Jr. (2007). Agotamiento y recuperación del glutatión después de la administración aguda de etanol en el ratón que envejece. Biochem Pharmacol . Manuscrito del autor; Disponible en PMC 2008 el 15 de mayo.
 101. Chen Y, Singh S. (2016) El agotamiento crónico del glutatión confiere protección contra la esteatosis inducida por alcohol: implicación para la activación redox de la vía de la proteína quinasa activada por AMP. Informes científicos volumen 6 , número de artículo: 29743. Publicado:12 de julio de 2016