



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**TÍTULO DEL INFORME DE SERVICIO SOCIAL**

**“Evaluación del efecto de la administración oral de glutatión liposomal sobre la  
concentración de tioles totales en un modelo murino”**

**PERTENECIENTE AL PROYECTO EXTERNO**

Evaluación de la biodisponibilidad de glutatión suministrado en un sistema liposomal y su  
impacto en marcadores de estrés oxidante en ratas Wistar macho

**Alumno:** Breindel González Escorza

**Matrícula:** 2193031384

**Lugar de realización:**

Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Durante el periodo comprendido del 15 de diciembre de 2023 al 15 de junio del 2024.

**V.o B.o de los asesores respecto a los contenidos académicos**

Dra. Betzabeth Anali García Martínez (No. de cédula 13385395)

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda (no. económico 16190)

## **1 TITULO**

Evaluación del efecto de la administración oral de glutatión liposomal sobre la concentración de tioles totales en un modelo murino

## **2 LUGAR DE REALIZACIÓN**

Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra". Laboratorio de Farmacología del servicio de Neurociencias Básica.

## **3 INTRODUCCION**

El término artritis reumatoide (AR) proviene de la etimología griega, la cual hace referencia a las articulaciones inflamadas y acuosas<sup>1</sup> Esta enfermedad fue descrita y clasificada por primera vez por el médico francés Augustin Jacob Landré-Beauvais en 1880, quien documentó las manifestaciones importantes de la enfermedad con el término "gota asténica", señalando que la afección tiene una mayor prevalencia en mujeres<sup>2</sup>. La AR es una enfermedad autoinmune, crónica y sistémica que progresa lentamente, un diagnóstico tardío puede llevar a daños articulares e incapacidad. Esta enfermedad es poliarticular y simétrica, afectando principalmente a las articulaciones periféricas. En el pasado, la AR se consideraba una enfermedad benigna, hoy se sabe que puede aumentar la tasa de mortalidad debido a las complicaciones asociadas. Los avances terapéuticos en la AR han mejorado y buscan controlar la progresión de la enfermedad para evitar lesiones articulares y discapacidad. se han sugerido estrategias terapéuticas que utilizan compuestos antioxidantes, considerándose como posibles tratamientos para reducir el daño causado en estas patologías<sup>3</sup>.

Sin embargo, la AR sigue siendo un tema de gran interés médico debido al desconocimiento de su etiología exacta, por lo que continúan surgiendo nuevas preguntas sobre el mejor enfoque para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por otra parte, se ha observado que la mayoría de los casos tienen una predisposición genética. Aún así, los factores genéticos no explican completamente la aparición de la enfermedad, por lo que se cree que factores ambientales, como agentes infecciosos, también pueden influir<sup>4</sup>.

## **4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION**

Los tioles, también llamados mercaptanos, son fundamentales en la homeostasis del organismo, particularmente en las reacciones redox. Estas moléculas forman enlaces de disulfuro reversibles, lo que permite mantener el equilibrio entre tioles y enlaces disulfuro<sup>5</sup>. Este equilibrio dinámico es crucial para varias funciones biológicas, incluyendo la protección antioxidante, si el equilibrio se desplaza hacia los enlaces disulfuro hace referencia a la presencia de un proceso de estrés oxidativo alterando las funciones biológicas esenciales, lo que puede llevar a padecimientos inflamatorios.

El glutatión (GSH) es considerado el tiol más abundante dentro de las moléculas que comprenden los tioles totales, por este motivo ha sido utilizado como alternativa terapéutica para padecimientos inflamatorios debido a su actividad antioxidante<sup>5,6</sup>. Actualmente se

buscan tecnologías alternativas para aumentar la biodisponibilidad de los antioxidantes después de la administración oral, ya que esta vía de administración es de fácil acceso y menos invasiva. Una de las desventajas del GSH administrado por vía oral es su alta susceptibilidad al ambiente ácido del estómago<sup>7</sup>, ya que se degrada fácilmente por lo que no se logra utilizar de manera eficiente. Aunque existen fuentes exógenas de GSH, como los alimentos que se absorben parcialmente en el intestino delgado<sup>8</sup> y el hígado. Sin embargo, debido a la presencia de gamma-glutamil transferasa (GGT) en estos órganos, el GSH se degrada en sus aminoácidos constituyentes<sup>9</sup>. Por ello, se propone administrar antioxidantes utilizando polímeros portadores, como los liposomas que tienen la capacidad de mantener aislado un compuesto químico del medio exterior. Esta propiedad, combinada con una alta compatibilidad con los organismos vivos, otorga a los liposomas la capacidad de encapsular una gran variedad de sustancias, como medicamentos, proteínas y material genético, las cuales, una vez encapsuladas, pueden ser transportadas por el torrente sanguíneo o por otros mecanismos para posteriormente ser liberadas en regiones específicas del cuerpo<sup>10</sup>. Esta característica nos ayudará a la protección de la integridad del glutatión y aumentará su eficacia al facilitar la movilidad de la estructura debido a su alta permeabilidad, aumentando con esto el nivel de tioles totales en el organismo<sup>11</sup>.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Determinar la cantidad de tioles totales en plasma, cerebro e hígado mediante técnicas espectrofotométricas tras la administración oral de glutatión liposomal como alternativa antioxidante en un modelo murino.

### **5.2 Específicos**

- 5.2.1 Estandarizar la técnica de espectrofotometría de UV-Vis para la determinación de tioles totales en plasma siguiendo los lineamientos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013.
- 5.2.2 Determinar la concentración de tioles totales en cerebro e hígado mediante espectrofotometría de UV-Vis tras su administración oral a ratas Wistar macho.
- 5.2.3 Determinar los niveles de tioles totales en plasma como indicador del estado redox del organismo empleando una técnica espectrofotométrica previamente estandarizada

## **6 ANTECEDENTES**

### **6.1 Estrés Oxidativo**

Los sistemas biológicos que viven en ambientes con oxígeno están continuamente expuestos a agentes oxidantes, ya sea como resultado de procesos metabólicos normales o como subproductos de otras reacciones químicas, principalmente son generados radicales libres tales como especies reactivas de nitrógeno (ERNs): óxido nítrico, radical peroxinitrito;

así como las especies reactivas de oxígeno (EROs): anión superóxido, anión peróxido, radical perhidroxilo, radical hidroxilo, entre otros<sup>12</sup>. El cuerpo humano mantiene un equilibrio constante entre procesos de oxidación y reducción, regulando la producción de pro-oxidantes generados durante el metabolismo celular y los sistemas antioxidantes de defensa. Cuando este equilibrio se ve alterado, se produce estrés oxidativo<sup>13,14</sup>. La gravedad del daño por estrés oxidativo puede ser reversible o irreversible, dependiendo de varios factores como la duración del estrés, la eficacia de los sistemas antioxidantes, la edad, el estado nutricional y factores genéticos que regulan los sistemas antioxidantes<sup>15</sup>

## **6.2 Radicales libres.**

Los electrones dentro de los átomos ocupan regiones llamadas orbitales, cada uno puede albergar un máximo de dos electrones. Un radical libre es entonces cualquier especie química que puede existir independientemente y que posee uno o más electrones no apareados en su capa electrónica externa, es decir, electrones que estén libres en un orbital<sup>16</sup>. Los electrones son más estables cuando están en parejas en un orbital, por lo que al tener electrones no apareados los radicales libres son inestables y más reactivos. Cuando dos radicales libres se encuentran, pueden combinar sus electrones no apareados y formar un enlace covalente. Un radical libre también puede donar su electrón no apareado a un compuesto no-radical o tomar un electrón de otra molécula para formar un par electrónico<sup>17</sup>. En estos casos, el radical libre deja de serlo y la otra molécula se convierte en un radical causando una reacción en cadena: un radical genera otro radical y así sucesivamente generando daño oxidativo, que puede afectar desde células individuales hasta tejidos completos<sup>15</sup>.

## **6.3 Especies reactivas.**

Dentro de los seres vivos existen diversas sustancias reactivas (SR) que pueden reaccionar con diferentes moléculas celulares. Hay dos clases principales de RS importantes a nivel celular: las EROs y las ERNs que pueden formarse como subproductos del metabolismo celular. Aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que tienen el potencial de convertirse fácilmente en radicales libres, lo que las hace dañinas para las células<sup>18</sup>.

### **6.3.1 Especies reactivas de oxígeno (EROS).**

Las EROs son moléculas inestables que contienen oxígeno y son reactivas con diversas estructuras celulares debido a la presencia de un electrón de valencia no apareado. Entre los radicales libres se encuentran el anión superóxido, hidroxilo, peroxilo, alcoxilo, hidroperoxilo y el radical óxido nítrico. Las EROs no radicales incluyen el oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, ozono, anión peroxinitrito, ácido hipocloroso, ácido hipobromoso y lípido hidroperóxido<sup>21</sup>.

Las EROs se producen de manera endógena en diversos orgánulos durante el metabolismo cotidiano y son esenciales para la producción de energía, la síntesis de elementos vitales, la fagocitosis y la transducción de señales<sup>20</sup>.

Además, su producción puede ser estimulada de manera exógena por factores ambientales como infecciones, exposición a radiación, ozono, herbicidas, en los últimos años. Se ha relacionado a las EROs y al estrés oxidativo con el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y el envejecimiento. Adicionalmente, los procesos oxidativos, están asociados con el daño al ADN, la oxidación de cadenas laterales, la desnaturalización y el daño directo de proteínas, así como con reacciones en lípidos<sup>21</sup>

### **6.3.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERNs).**

Las especies reactivas del nitrógeno son una familia de moléculas antimicrobianas derivadas del óxido nítrico (NO), el cual es producido por la actividad enzimática del óxido nítrico sintasa (NOS<sub>2</sub>). Esta enzima es principalmente expresada en macrófagos tras su inducción por citoquinas y productos microbianos, especialmente interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y lipopolisacáridos (LPS). Las ERNs se generan a través de la reacción del óxido nítrico con superóxido, formando peroxinitrito. Actúan en conjunto con las especies reactivas de oxígeno en el daño celular, provocando estrés nitrosativo<sup>22</sup>.

### **6.4 Sistemas de defensa antioxidantes.**

El cuerpo humano dispone de sistemas antioxidantes tanto internos como externos que regulan y controlan la actividad y producción de EROs Y ERNs. Entre los antioxidantes endógenos más relevantes se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), que convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno; la catalasa (CAT), que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; y el glutatión peroxidasa (Gpx), que oxida el glutatión y reduce el peróxido de hidrógeno. González-Urbaneja<sup>23</sup>, el sistema antioxidante del glutatión incluye el glutatión reducido (GSH) y la enzima glutatión reductasa (GRd), que regenera el glutatión oxidado. Asimismo, la transferrina y la ceruloplasmina son proteínas con funciones antioxidantes. En cuanto a los antioxidantes exógenos, destacan las vitaminas A, C y E, los polifenoles, la melatonina y ciertos metales, estas sustancias incluso en pequeñas cantidades pueden ralentizar o prevenir la oxidación, funcionando de las siguientes maneras<sup>24, 25</sup>:

- Disminuyendo la concentración de oxidantes, lo que reduce la posibilidad de que ocurran reacciones de oxidación.
- Evitando las reacciones en cadena ya que pueden interceptar o neutralizar los radicales libres iniciales.
- Uniéndose a iones metálicos, evitando así la creación de especies reactivas que podrían promover la oxidación.

- Transformando los peróxidos, en sustancias menos reactivas, disminuyendo su capacidad de causar daño
- Evitando la cadena de reacciones que incrementan el número de radicales libres, evitando su propagación y los daños asociados.

### **6.5 Reacciones y homeostasis redox.**

En el metabolismo oxidativo, siempre se producen reacciones de transferencia de electrones que generan especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas reacciones de un solo electrón con otras moléculas resultan en la formación de EROs secundarios, como radicales peroxilo, radicales alcoxis y otros radicales orgánicos<sup>26</sup>. Aunque estos radicales secundarios no son tan tóxicos ni reactivos como los radicales hidroxilos (OH<sup>-</sup>), que son muy electrofílicos, inducen y promueven reacciones en cadena que llevan a la co-oxidación y peroxidación de biomoléculas, estas son catalizadas por metales de transición y ocurren en tres etapas: iniciación, propagación y terminación<sup>27</sup>. La concentración de estos radicales está determinada por el equilibrio entre la velocidad de producción de especies reactivas y la velocidad de eliminación mediante compuestos y enzimas antioxidantes. Las células tienen varios mecanismos para restablecer el estado redox después de una exposición temporal a concentraciones elevadas de radicales libres. El aumento en los niveles de estas especies reactivas induce la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antioxidante, como las enzimas antioxidantes o moléculas que aumentan el transporte de cistina, incrementando los niveles intracelulares de glutatión. Además, el aumento en la proteólisis proporciona aminoácidos libres que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis redox<sup>15</sup>. Por otro lado, el desequilibrio puede manifestarse en diversas enfermedades degenerativas, infecciosas, inmunológicas o inflamatorias. La alteración en el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes puede variar en su magnitud. En casos de estrés oxidativo leve, los sistemas antioxidantes son suficientes para restaurar dicho equilibrio. Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo grave, se producen alteraciones importantes en el metabolismo celular, como la fragmentación del ADN o el daño a los transportadores de iones en las membranas celulares y la peroxidación de lípidos<sup>28</sup>.

### **6.6 Artritis reumatoide.**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, autoinmune, de origen multifactorial y de carácter sistémico, crónico y progresivo, que afecta las membranas sinoviales de múltiples articulaciones<sup>29,30</sup>

Se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, se presenta en todas las razas y empeora con el aumento de la humedad atmosférica<sup>31</sup>. En esta enfermedad se produce activación de los leucocitos en el líquido sinovial, con liberación de citoquinas proinflamatorias y radicales libres que inician la inflamación y atraen a otras células inmunológicas al sitio. Con el progreso de la enfermedad las especies reactivas de oxígeno median la destrucción del cartílago y contribuyen a la sinovitis proliferativa, en particular, la IL- 8 que podría ser la responsable de atraer neutrófilos, células que también liberan especies reactivas del oxígeno

(EROs)<sup>32</sup>. La alteración inicial parece ser una reacción inflamatoria inespecífica provocada por un estímulo desconocido. Esta se presenta como una inflamación autoinmune en la membrana sinovial, caracterizada por la infiltración de células inflamatorias, principalmente células T y macrófagos. Este proceso conduce a una lesión microvascular y un aumento en el número de células del revestimiento sinovial, así como inflamación perivascular por células mononucleares<sup>33</sup>.

Posteriormente, la inflamación se extiende al cartílago y hueso adyacentes, causando daño articular. No se comprende completamente el mecanismo exacto de destrucción del cartílago y el hueso, aunque el líquido sinovial contiene enzimas capaces de degradar el cartílago. La mayor parte de la destrucción ocurre en las áreas adyacentes a la membrana sinovial inflamada que se extiende y cubre el cartílago articular<sup>34</sup>.

### **6.7 Daño Oxidativo y artritis reumatoide**

El estrés oxidativo en una célula provoca efectos tóxicos al oxidar lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo que resulta en la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. La oxidación también altera la estructura de algunas proteínas y produce la formación de agregados proteínicos anormales, los cuales inducen daño oxidativo y están asociados con enfermedades neurodegenerativas<sup>35</sup>. Un ejemplo de esto es la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la Artritis Reumatoidea (AR), que se caracteriza por un aumento marcado del estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes. Las EROs no neutralizadas por las defensas antioxidantes reaccionan con proteínas, ADN, ARN y lípidos de las membranas celulares, lo que ocasiona bloqueos en los pasos del metabolismo celular y disfunción mitocondrial, llevando al fracaso energético celular<sup>36</sup>.

### **6.8 Tioles totales.**

Los tioles (R-SH) son compuestos que poseen un grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno, lo que les confiere una alta capacidad de oxidación. Debido a su notable reactividad con especies reactivas, la conversión de tioles en disulfuros (R-SS-R) se considera relacionada con un aumento en la carga de prooxidantes en células y tejidos. La relación molar tiol/disulfuro (R-SH/R-SS-R) en células y tejidos puede servir como un indicador útil del estrés oxidativo<sup>37</sup>.

Los tejidos de los mamíferos contienen altos niveles de tioles proteicos (20-40 mM), y muchas proteínas intracelulares pueden experimentar modificaciones en sus grupos tiol. El estado redox de estos tioles proteicos varía según la localización celular por ejemplo, las cisteínas en las proteínas pueden oxidarse formando tioles libres, disulfuros intra o interproteicos, nitrosotioles, así como ácidos sulfénicos, sulfínicos o sulfónico, en el citoplasma, el entorno es altamente reducido debido a la elevada concentración de GSH y una relación GSH/GSSG de 30-100, por lo que las cisteínas de las proteínas citoplasmáticas predominan como tioles libres<sup>38</sup>. En contraste, las proteínas extracelulares suelen estar en

forma de disulfuros debido al entorno oxidativo. Las proteínas de la membrana plasmática se encuentran en una zona intermedia entre ambientes oxidantes y reductores, y muchos estudios han mostrado que los tioles proteicos exofaciales se mantienen en estado reducido gracias a las isomerasas de disulfuro proteico. La albúmina, la proteína más abundante en el plasma que representa más del 50% de la proteína plasmática total, contiene la mayoría de los tioles plasmáticos y actúa como principal antioxidante en los fluidos corporales<sup>39</sup>.

Los tioles, las moléculas oxidantes y los antioxidantes celulares, que actúan como segundos mensajeros, ha llevado a una nueva definición del estrés oxidativo. Esta definición se basa en los cambios en las modificaciones postraduccionales de los tioles en proteínas, que son cruciales para la regulación y el control redox. Los pares redox basados en tioles, como GSH/GSSG, cisteína/cistina y tioredoxina reducida/oxidada, funcionan como nodos de señalización independientes que regulan selectivamente los eventos de desarrollo y están estrechamente vinculados a los cambios en los potenciales redox intracelulares<sup>40</sup>.

### **6.9 Glutación (GSH).**

Es el tiol no proteico más abundante en las células y tiene una serie de funciones entre las que se encuentran protección de las macromoléculas del daño oxidativo y mantenimiento de las funciones inmunitarias, el cuerpo lo sintetiza a partir de la cisteína, el ácido glutámico y la glicina. La disponibilidad de cisteína es crucial para mantener niveles adecuados de glutación, y su escasez puede llevar a una disminución en los niveles de este antioxidante. Se ha observado que la reducción de glutación está asociada con diversas condiciones perjudiciales, que van desde un deterioro en la función inmune hasta un mayor riesgo de enfermedades crónicas. Sin embargo, el glutación puede ser degradado en el ambiente ácido del estómago tras su consumo oral, por lo que se han desarrollado estrategias para protegerlo y asegurar su entrega al intestino después de la ingesta<sup>41</sup>.

### **6.10 Liposomas.**

Las moléculas anfifílicas, como los fosfolípidos, pueden formar membranas de manera espontánea, creando bicapas que pueden luego transformarse en vesículas llamadas liposomas, los cuales tienen estructuras esféricas que están compuestas por una o varias capas de fosfolípidos, cuentan con un espacio acuoso en su interior que está separado del medio acuoso circundante en el que están suspendidos. La bicapa lipídica que conforma la membrana actúa como una barrera, lo que hace que los liposomas sean considerados vehículos idóneos para el transporte de fármacos, protegiéndolos de la degradación en el medio biológico tras su administración, además de que, al estar formados por enlaces no covalentes, pueden ser modificados fácilmente para alterar su composición química, la fluidez de sus cadenas hidrocarbonadas, la hidrofiliidad de su superficie y su tamaño<sup>42</sup>.

Los sistemas de liberación de fármacos mediante liposomas han sido utilizados para potenciar el efecto terapéutico de fármacos muy potentes. En la actualidad se considera que la mayoría de las formulaciones de liposomas reducen la toxicidad y aumentan la

concentración de los fármacos en el sitio de acción. Estas formulaciones controlan la rápida eliminación biológica de los liposomas ajustando su tamaño, carga e hidratación superficial. La experiencia clínica con estos sistemas ha permitido diseñar liposomas dirigidos específicamente a ciertos tejidos o células, ya sea mediante la inclusión de moléculas que reconocen una ubicación específica en su membrana o sin ellas. Los fármacos que han demostrado una mejora en su seguridad y eficacia mediante el uso de liposomas incluyen agentes contra el cáncer, antivirales, antifúngicos, antibióticos, vacunas y agentes terapéuticos genéticos<sup>43</sup>.

### **6.11 Características de los liposomas.**

En la preparación de liposomas, no se puede asumir que tienen las características deseadas para la encapsulación del principio activo, por tal motivo es esencial que los parámetros fisicoquímicos garanticen que la preparación de los liposomas sea adecuada y reproducible. Por lo tanto, entre las características más comunes que se encuentran en la caracterización de un sistema liposomal, se encuentran: el porcentaje y la eficacia de encapsulación, la estabilidad, el tamaño medio, la distribución del tamaño, la forma, la polidispersidad, la carga superficial, la composición química, y, especialmente, la distribución exacta del tamaño de la suspensión liposomal, ya que este parámetro puede afectar la función del liposoma en el organismo<sup>44</sup>.

## **7 METODOS**

### **7.1 Animales**

Se utilizaron 18 ratas Wistar macho con un peso entre 250 – 270 g, que fueron alojadas en un ambiente controlado, a una temperatura de  $22 \pm 5$  °C y HR  $55 \pm 5\%$ . Con comida y agua ad libitum. Los animales fueron divididos en 3 grupos.

Los procedimientos fueron realizados siguiendo las recomendaciones del comité de ética para el manejo de animales de laboratorio de la unidad de producción y experimentación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra así como de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación, 1999). Todos los experimentos serán realizados durante la fase de luz y el número de unidades experimentales se mantendrá al mínimo posible (n= 6).

### **7.2 Diseño experimental**

Los animales fueron identificados con un número y divididos en los siguientes grupos (n= 4-6):

Grupo A: Animales tratados con N-acetilcisteína por dos semanas, como precursor de GSH; se administró vía oral (p.o.) 266 mg/kg de NAC (24) preparado con agua destilada, a través de una sonda.

Grupo B: Animales tratados con 500mg/kg de glutatión liposomal (25) p.o. (producto de referencia).

Grupo C: Animales tratados con Glutafixx (500 mg/kg de glutatión; producto de prueba nacional).

La administración p.o. se realizó con la ayuda de una sonda de acero inoxidable curva calibre 16x3'' con punta roma (26). Los tratamientos se administraron durante 14 días y sacrificaron en el día 15 por decapitación. Se obtuvieron muestras de sangre, cerebro e hígado y las cuales se mantuvieron en almacenamiento a -70 °C hasta su análisis.

## 8 RESULTADOS Y DISCUSION

En este estudio se analizó la concentración de tioles totales posterior a la administración de N-acetilcisteína y glutatión liposomal (producto nacional e internacional) en un modelo murino, durante 14 días. Estos antioxidantes, principalmente GSH, son capaces de reaccionar con los radicales libres, lo cuales son responsables del estrés oxidante y que pueden estar involucrados en procesos inflamatorios y patologías de múltiples enfermedades. La técnica utilizada para cuantificarlos tiene como principio la determinación de l-cisteína, usando el método de Ellman. Esto debido a que los tioles totales presentes en la muestra reaccionan con este compuesto, provocando la ruptura del enlace disulfuro y formando 2-nitro-5-benzoato, que se ioniza en el diasnion TNB<sup>-2</sup> en pH alcalino, produciendo un color amarillo exhibiendo la presencia de tioles totales.

En la tabla 1 se muestra el contenido de tioles en plasma, núcleo estriado, hipocampo e hígado en los diferentes grupos de tratamiento. El rango observado en plasma se encuentra entre 24.14 a 33.59, mientras que en cuerpo estriado el rango es de 0.55 a 0.69, seguido de hipocampo que es de 0.53 a 1.08, finalmente el rango de tioles en hígado es de 0.83 a 1.034 µg tioles/ mg tejido.

Tabla 1. Cantidad de tioles totales expresada en µg tioles/ mg tejido.

µg tioles/ mg tejido				
Tejido/Grupo	Control	NAC	Referencia	Nacional (MX)
<b>Plasma</b>	24.14 ± 6.53	28.83 ± 1.90	33.59 ± 0.10	26.83 ± 3.87
<b>Estriado</b>	0.55 ± 0.10	0.62 ± 0.10	0.69 ± 0.09	0.58 ± 0.07
<b>Hipocampo</b>	0.53 ± 0.04	0.59 ± 0.07	1.08 ± 0.10	0.63 ± 0.06
<b>Hígado</b>	1.04 ± 0.07	0.83 ± 0.16	1.34 ± 0.17	1.13 ± 0.12

Uno de los principales retos durante la determinación de tioles es que los productos de oxidación de los residuos de cisteína en las proteínas son inestables. Estos productos pueden ser reducidos rápidamente por otros tioles, lo que podría dificultar su cuantificación<sup>45</sup>.

En las muestras de hígado analizadas no se observa una diferencia significativa entre los grupos analizados (Grupo Control, NAC, Glutatión liposomal nacional y glutatión liposomal referencia) se muestra la misma tendencia en las muestras tomadas de partes del cerebro (hipocampo y cuerpo estriado) y en las muestras de plasma. Ahora bien, la evidencia sugiere que el NAC es un antioxidante relativamente débil en comparación con el GSH

liposomal.<sup>25</sup> Los estudios que evalúan directamente su capacidad antioxidante indican que se requiere aproximadamente 10 veces más NAC para neutralizar radicales centrados en oxígeno de manera similar al GSH<sup>46</sup>. Por lo tanto, es probable que la mayoría de los efectos antioxidantes atribuidos al NAC se deban al aumento de los niveles intracelulares de GSH. Esta distinción es de suma importancia, ya que implica que para que el NAC ejerza su efecto antioxidante, es necesario que las enzimas responsables de la síntesis de GSH estén intactas y funcione adecuadamente, y que los niveles de GSH estén reducidos para que el NAC pueda ser beneficioso. Sin embargo, a diferencia de GSH NAC es estable en un rango de pH ácido<sup>47</sup> y no debería degradarse significativamente en el estómago a diferencia de GSH que debe ser acompañado de un liposoma para evitar ser degradado, se cree que por este motivo en el grupo NAC y GSH se obtuvieron resultados similares en concentración de tioles totales.

El mecanismo mediante el cual las EROs alteran el estado redox celular general implica inicialmente la oxidación de tioles accesibles libres y unidos a proteínas<sup>48</sup> la mayor cantidad de tioles totales en las muestras analizadas se observa en plasma, seguido del hígado para finalizar con la menor concentración  $\mu\text{g}$  tioles/  $\text{mg}$  tejido en cerebro. Se sugiere con base en la literatura<sup>49</sup> que el agotamiento, de los tioles intracelulares se debe a su alta nucleofílica, ya que los tioles en péptidos y proteínas son particularmente vulnerables a la oxidación directa por EROs además algunos tioles proteicos se oxidan selectivamente por niveles bajos y fisiológicos de oxidantes.

Diversos autores mencionan que cualquier condición que cause un exceso de EROS tiende a reducir los niveles de Tioles totales. Dentro de las células, los tioles se encuentran en concentraciones milimolares<sup>50</sup>, sin embargo y posterior a los tratamientos las concentraciones obtenidas reflejan con precisión el estado redox celular y si es un indicador confiable de estrés oxidativo. Niveles bajos de Tioles totales no siempre se deben a la oxidación, sino que podrían estar relacionados con una deficiencia en los niveles de cisteína, el precursor limitante de Tioles totales, a menudo causada por una deficiencia nutricional.

La composición y el estado redox de los tioles presentes en un tejido específico son altamente variables y probablemente influyen en la determinación de la actividad metabólica en cada muestra analizada. En general, resulta beneficioso incrementar la disponibilidad de antioxidantes específicos en situaciones de estrés oxidativo ya que las células han desarrollado varios mecanismos para aumentar los niveles intracelulares de tioles, como el GSH y la tiorredoxina, en respuesta a diversas formas de estrés. Los tioles exógenos se han utilizado con éxito para elevar los niveles de tioles en células y tejidos en cultivos celulares, en modelos animales y en humanos<sup>51</sup>.

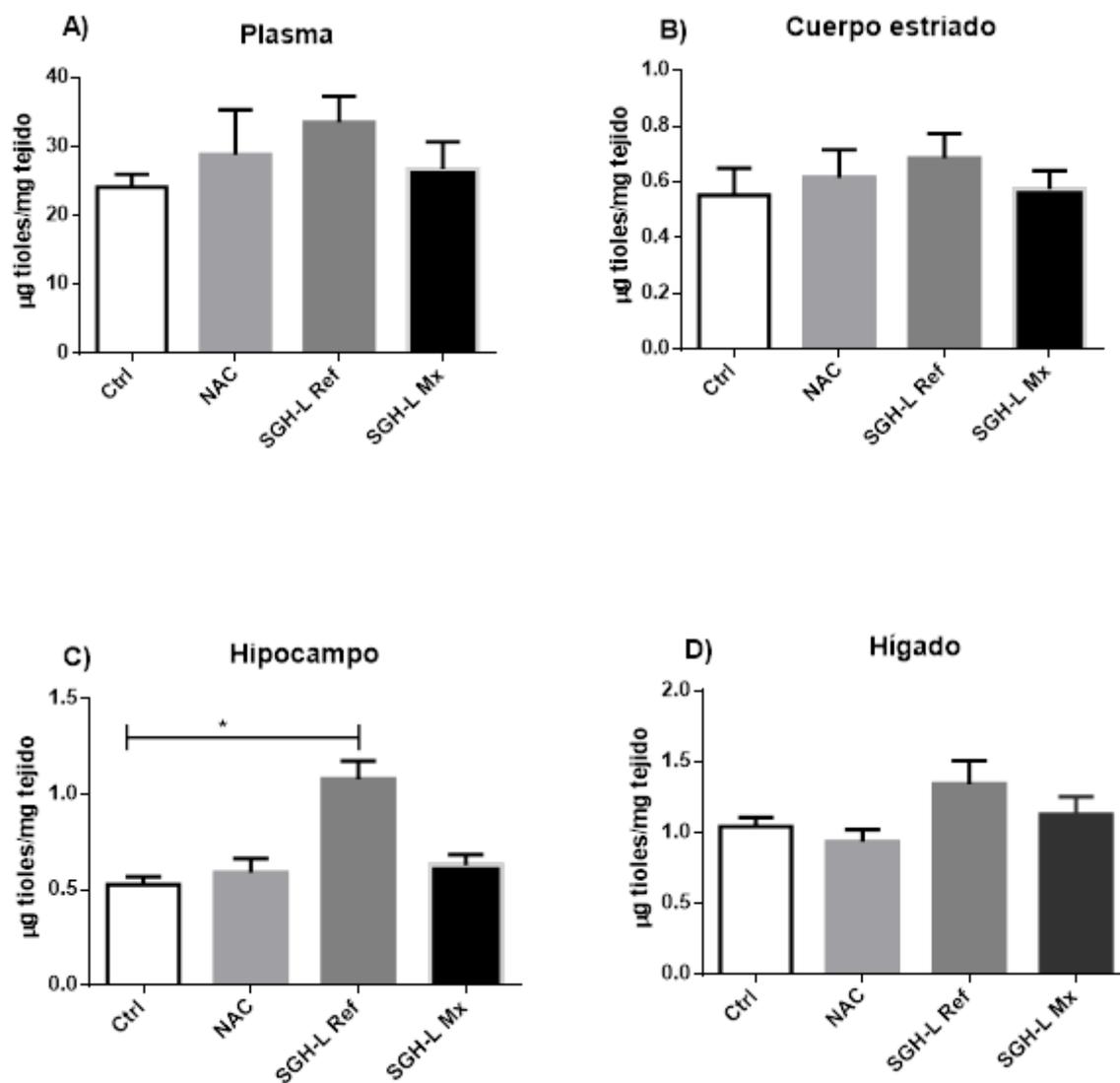


Figura 1. Concentración de tioles totales en muestras analizadas. A) Plasma, no se observan diferencias significativas entre los grupos analizados. B) Cuerpo estriado, no se observan diferencias significativas entre los grupos analizados. C) Hipocampo, se observa diferencias significativas entre el grupo SGH-L Ref y los grupos Ctrl, NAC, SGH-L MX. D) no se observan diferencias significativas entre los grupos analizados.

## 9 CONCLUSION

La cantidad de tioles totales indica que el organismo necesita los medios para reducir los efectos del estrés oxidativo y por ello produce el aumento de las concentraciones de los Tioles totales en plasma sin embargo cuando el estrés oxidativo es excesivo se obtiene como resultado la oxidación irreversible de los Tioles lo que resulta en la muerte celular, nuestros datos respaldan que el estrés oxidativo promueve el aumento de tioles totales como defensa antioxidante posterior a la administración de N-acetilcisteína y Glutación liposomal.

Los tioles totales, que comprenden compuestos como el glutatión y la cisteína, desempeñan un papel clave en la protección antioxidante del cuerpo. Estos compuestos neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otras moléculas reactivas, previniendo así el daño oxidativo en proteínas, lípidos y ADN. Además, los tioles son esenciales en procesos de detoxificación y en la restauración de otros antioxidantes, como la vitamina C y la vitamina E.

Evaluar los niveles de tioles totales en el organismo puede ofrecer información crucial sobre el equilibrio redox celular y la capacidad antioxidante general del cuerpo. Por lo tanto, su análisis no solo es importante para entender los mecanismos del estrés oxidativo, sino también para desarrollar tratamientos que reduzcan el daño oxidativo y ayuden a prevenir enfermedades relacionadas.

## 10 BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez, E. C. (2017). Actualización del tratamiento de la artritis reumatoide Update of the rheumatoid arthritis' treatment.
2. Landré-Beauvais, A. J. (2001). The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. *Joint bone spine*, 68(2), 130-143.
3. Torres, L. E., Barbera, A., & del Carmen Domínguez, M. (2008). Principales estrategias terapéuticas en el tratamiento de la artritis reumatoide. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 39(3), 183-190.
4. Pratt, A. G., Isaacs, J. D., & Matthey, D. L. (2009). Conceptos actuales en la patogénesis de la artritis reumatoide precoz. *Mejores Prácticas e Investigación en Reumatología Clínica*, 23(1), 37-48.
5. Lu, S. C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB journal*, 13(10), 1169-1183.
6. Martínez Sarrasague, M., Barrado, D. A., Zubillaga, M., Hager, A., De Paoli, T., & Boccio, J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 40(1), 45-54.
7. Sinha, R., Sinha, I., Calcagnotto, A., Trushin, N., Haley, J. S., Schell, T. D., & Richie, J. P. (2018). Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function. *European journal of clinical nutrition*, 72(1), 105-111.
8. Gould, R. L., & Pazdro, R. (2019). Impact of supplementary amino acids, micronutrients, and overall diet on glutathione homeostasis. *Nutrients*, 11(5), 1056
9. Wróblewska, J., Wróblewski, M., Hołyńska-Iwan, I., Modrzejewska, M., Nuskiewicz, J., Wróblewska, W., & Woźniak, A. (2023). The Role of Glutathione in Selected Viral Diseases. *Antioxidants*, 12(7), 1325.
10. Salazar, R, Olivarez, L. (2022) Liposomas, de la física biológica a la medicina molecular. *Ciencia*. Vol 73, 3. 22:27.

11. Setti, T., Arab, M. G. L., Santos, G. S., Alkass, N., Andrade, M. A. P., & Lana, J. F. S. D. (2021). The protective role of glutathione in osteoarthritis. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*, 15, 145-151.
12. D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). EROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in EROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 813-824.
13. Harman D. Free radicals theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In: *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. Alan R. Liss, Inc. Ed. 1986: 3-49.
14. Rivas, A. S., Colín-Barenque, L., Dorado-Martínez, C., & Fortoul, T. (2001). Estrés oxidativo y neurodegeneración en temas selectos de neurociencias II. *UNAM. PUIS*.
15. Martínez, C. D., Vargas, C. R., & Arancibia, S. R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med*, 46(6), 229-235.
16. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26.
17. Korc, I., Bidegain, M., & Martell, M. (1995). Radicales libres. *Rev Med*, 11, 121-135.
18. Espejo, G. Z. (2018). La investigación y las revistas científicas. *REBIOL*, 38(2), 2-2.
19. Sarangarajan, R. S. P. G., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., & Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(12), 1111-1116.
20. Revilla Flores, E. M. (2021). Especies reactivas de oxígeno, importancia e implicación patológica. *Revista científica ciencia médica*, 24(2), 125-132.
21. COLLADO, E., & ALVIRA, D. (1994). Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Medicina clínica*, 103(5), 189-196.
22. Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., ... & Puppo, A. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1769-1776.
23. I. (2006). Radicales libres: Algunas consideraciones clínicas. *Gaceta Médica de Caracas*, 114(2), 91-98.
24. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
25. Guija-Guerra, H., & Guija-Poma, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 23(2).
26. Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.
27. Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1-2), 53-67.
28. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
29. Sarli, B., Baktir, A. O., Cebicci, M., Dogan, Y., Demirbas, M., Kurtul, S., ... & Arinc, H. (2014). Predictors of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Angiology*, 65(9), 778-782.
30. Ibn Yacoub, Y., Amine, B., Laatiris, A., & Hajjaj-Hassouni, N. (2012). Rheumatoid factor and antibodies against citrullinated peptides in Moroccan patients with rheumatoid arthritis: association with disease parameters and quality of life. *Clinical rheumatology*, 31, 329-334.
31. Charles J, Britt H, Pan Y. Rheumatoid arthritis. *Aust Fam Physician*. 2013;42(11):765
32. Stamp, L. K., Khalilova, I., Tarr, J. M., Senthilmohan, R., Turner, R., Haigh, R. C., ... & Kettle, A. J. (2012). Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51(10), 1796-1803.
33. McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205-2219

34. McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205-2219.
35. Poli, G. (2000). *Free radicals in brain pathophysiology*. CRC Press.
36. Gómez, I. D. Relacion Artritis Reumatoidea-Estres Oxidativo-Ozonoterapia.
37. Harris, C., & Hansen, J. M. (2012). Oxidative stress, thiols, and redox profiles. *Developmental Toxicology: Methods and Protocols*, 325-346.
38. Agan, V., Celik, H., Eren, M. A., Agan, F. Z., Erel, O., Neselioglu, S., ... & Gonel, A. (2019). An investigation of oxidative stress and thiol/disulphide homeostasis in Graves' disease. *Medicina*, 55(6), 275.
39. Ozyazici, S., Karateke, F., Turan, U., Kuvvetli, A., Kilavuz, H., Karakaya, B., ... & Erel, O. (2016). A novel oxidative stress mediator in acute appendicitis: thiol/disulphide homeostasis. *Mediators of inflammation*, 2016(1), 6761050.
40. Kükürt, A., Gelen, V., Başer, Ö. F., Deveci, H. A., & Karapehlivan, M. (2021). Thiols: Role in oxidative stress-related disorders. *Accenting Lipid Peroxidation. London: IntechOpen*, 27-47. *Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849-C868.
41. Sinha, R., Sinha, I., Calcagnotto, A., Trushin, N., Haley, J. S., Schell, T. D., & Richie, J. P. (2018). Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function. *European journal of clinical nutrition*, 72(1), 105-111.
42. Villafuerte-Robles, L., (2009). NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. Razón y Palabra, (68), 1-20.
43. Lian, T., & Ho, R. J. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90(6), 667-680.
44. Kanášová, M., & Nesměrák, K. (2017). Systematic review of liposomes' characterization methods. *Monatshefte für chemie-chemical monthly*, 148, 1581-1593.
45. Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., ... & Ghezzi, P. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 23(14), 1144-1170.
46. Gibson, K. R., Neilson, I. L., Barrett, F., Winterburn, T. J., Sharma, S., MacRury, S. M., & Megson, I. L. (2009). Evaluation of the antioxidant properties of N-acetylcysteine in human platelets: prerequisite for bioconversion to glutathione for antioxidant and antiplatelet activity. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 54(4), 319-326.
47. Pedre, B., Barayeu, U., Ezeriņa, D., & Dick, T. P. (2021). The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H<sub>2</sub>S and sulfane sulfur species. *Pharmacology & therapeutics*, 228, 107916.
48. Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine*, 30(11), 1191-1212.
49. Karimi, M., Crossett, B., Cordwell, S. J., Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2020). Characterization of disulfide (cystine) oxidation by HOCl in a model peptide: Evidence for oxygen addition, disulfide bond cleavage and adduct formation with thiols. *Free Radical Biology and Medicine*, 154, 62-74.
50. Gasteiger, J., Hutchings, M. G., Christoph, B., Gann, L., Hiller, C., Löw, P., ... & Yuki, K. (1987). A new treatment of chemical reactivity: Development of EROS, an expert system for reaction prediction and synthesis design. In *Organic Synthesis, Reactions and Mechanisms* (pp. 19-73). Springer Berlin Heidelberg.
51. Deneke, S. M. (2001). Antioxidantes a base de tiol. *Temas actuales de regulación celular*, 36, 151-180.