



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

DETERMINACIÓN DE TIOLES TOTALES EN MUESTRAS DE LÍQUIDO SINOVIAL DE
PACIENTES CON OSTEOARTRITIS

Licenciatura en Química farmacéutica Biológica

Fecha de inicio: 30/11/2023

Fecha de término: 30/05/2024

Realizado en: Laboratorio de Neurofarmacología de la UAM Xochimilco

Alumno: Salvador Guillermo Galindo Orozco

Matrícula: 2202032159

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Vo. Bo. De los asesores respecto a los contenidos académico

Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

No. Eco. 26848

Dr. Luis Antonio Tristán López

Ced. Prof. 12395354

Introducción:

La osteoartritis (OA), también conocida como artrosis es una enfermedad degenerativa crónica que afecta principalmente a los adultos mayores de 60-65 años y progresa conforme aumenta la edad. Además, es considerado uno de los principales problemas musculoesqueléticos (Xia *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2015) y afecta a las articulaciones grandes y pequeñas, localizadas en manos, rodillas, cadera, columna vertebral, por mencionar algunos. Esta enfermedad es una de las afecciones articulares observadas con más frecuencia en la población adulta y se ubica entre las primeras 10 causas de atención hospitalaria (Espinosa *et al.* 2018). A nivel mundial el 9.6% de los hombres y 18% de mujeres padecen de OA (Pereira *et al.* 2015) y en EUA el 37.4% de los adultos mayores de 60 años padecen esta enfermedad. En la población mexicana se estima que su prevalencia es del 10.5% y presentándose de igual manera mayoritariamente en mujeres que en hombres (Espinosa *et al.* 2018).

Dentro de los principales síntomas de la enfermedad son dolor crónico, la rigidez, inestabilidad articular, deformidades articulares, estrechamiento del espacio articular, crepitación, entre otros (Xia *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2015; Martel *et al.* 2016). La OA no solo afecta el cartílago articular, sino que también puede involucrar daño en el hueso subcondral, tendones, el sinovio, los discos articulares y músculos que rodean la articulación (Li *et al.* 2012). Si bien esta enfermedad está comúnmente relacionada a los adultos mayores, también existen otros factores que favorecen su aparición, tal es el caso de la predisposición genética, obesidad, lesiones previas, actividad física intensa, enfermedades inflamatorias crónicas, entre otros (Pereira *et al.* 2015).

Estudios han sugerido que durante el desarrollo de la OA hay un incremento del estrés oxidante. Este último se define como un desequilibrio entre las concentraciones de oxidantes y antioxidantes, en el cual se encuentra incrementado la concentración de los oxidantes, provocando un mal funcionamiento bioquímico y celular.

Existen diversos tipos de especies reactivas, siendo las de oxígeno (EROS) las causantes del estrés oxidante y las de mayor importancia por su grado de reactividad con lípidos

insaturados y tioles intracelulares (Li *et al.* 2012; Baba & Bhatnagar 2018; Zahan *et al.* 2020). El grupo tiol es un componente de aminoácidos que constituyen enzimas que tienen función neutralizante ante la peroxidación de los lípidos, debido a su alta nucleofilicidad (Baba & Bhatnagar 2018; Zahan *et al.* 2020). El grupo tiol es un grupo sulfhídrico (R-SH), presentes en biomoléculas que por su alta nucleofilicidad, propiedad de reducción y quelación, cumple un rol importante como antioxidante, ya que actúan descomponiendo las EROS y la medición de su concentración es uno de los indicadores del estado antioxidante en el que se encuentra el organismo (Agan *et al.* 2019). Entre los diferentes métodos para la determinación de tioles se ha tomado como referencia el uso del reactivo de Ellman, para la determinación de tioles, tomando en cuenta para su cuantificación a la L-Cisteína (L-Cis), la cual es un aminoácido que contiene al grupo sulfhidrilo que confiere actividad antioxidante a otras moléculas, tal es el caso del glutatión, que consta de tres aminoácidos (glutamato, glicina y cisteína) que actúa como antioxidante endógeno principal (Hu. 1994; Yang & Guan. 2015; Guillén *et al.* 2016).

Justificación:

Zahan y colaboradores (2020) señalan la existencia de la correlación entre la OA y el estrés oxidativo, al resumir la contribución de las vías de señalización del estrés oxidante con la OA conduciendo a al reblandecimiento y pérdida del cartílago, inflamación sinovial, entre otros. Además, se ha demostrado que la inflamación del sinovio se encuentra regulada por factores bioquímicos, en los que las EROS favorecen la oxidación de proteínas, lípidos y pueden causar daños en el ADN, induciendo a la apoptosis de los sinoviocitos en estudios *in vitro* cuando estas exceden la capacidad de la célula para reparar el daño, generando degradación del tejido (Li *et al.* 2012; Leptos & Papavassiliou. 2016; Ansari *et al.* 2020; Zahan *et al.* 2020).

Por otra parte, un estudio realizado por Ozler y colaboradores (2022) en el que se determinó las concentraciones de tioles totales en muestras séricas de pacientes con osteoartritis en una etapa temprana y tardía de la enfermedad, demostró que la disminución de tioles totales está correlacionada con la progresión de OA, teniendo un gran potencial como marcador para el diagnóstico de la etapa en la que se encuentra el paciente. Sin embargo, es importante mencionar que los autores señalan que este estudio tiene como limitación el número de

participantes n=118 y no haber evaluado otros factores de riesgo como los son las citocinas proinflamatorias y las proteasas.

Actualmente existen técnicas para el diagnóstico de OA, como las radiográficas que indican la degradación del cartílago articular, usando las escalas de Kellgren-Lawrence, Ahlback y Brandt, que buscan una estandarización para la interpretación de los estudios si embargo, presenta baja precisión en las primeras etapas, ya que en puede pasar por alto a pacientes que padezcan la enfermedad, otras técnicas empleadas son la resonancia magnética y la artroscopía, para los cuales se requiere de personal especializado o limitaciones para su uso porque no puede ser empleado rutinariamente para desgaste articular (Kijowski *et al.* 2006; Kohn *et al.* 2016; Cámara *et al.* 2020). Teniendo esto en cuenta, los tioles (-SH) desempeñan un papel importante en la regulación del estrés oxidativo y el recuento de tioles totales es una técnica utilizada para conocer su cantidad en una muestra, proporcionando información sobre el equilibrio redox, y presentando un potencial como biomarcador para el diagnóstico de la etapa de OA en los pacientes.

Objetivo general:

Determinar la concentración de tioles totales en el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis utilizando la espectrofotometría Vis, para proporcionar información sobre el papel del estrés oxidante en la patogénesis de la enfermedad.

Objetivos específicos:

- Estandarizar y validar un método para la determinación de la concentración de tioles totales en muestras de líquido sinovial, utilizando la espectrofotometría Vis y siguiendo los lineamientos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013.
- Determinar la concentración de tioles totales en muestras de líquido sinovial de pacientes con osteoartritis para conocer el estado de oxidación del organismo del paciente.
- Discutir los hallazgos obtenidos y su relevancia en el contexto de la patogénesis de la osteoartritis, considerando el papel del estrés oxidativo y la importancia de los tioles totales como biomarcadores.

Antecedentes:

La osteoartritis (OA), es una enfermedad degenerativa que daña las articulaciones debido a un desgaste del cartílago, provocando rigidez, dolor y pérdida de la movilidad, hasta deterioro óseo siendo de los principales problemas musculoesqueléticos en los adultos mayores debido a su alta prevalencia, provocando incapacidad (Xia *et al.* 2014; Figueroa *et al.* 2015; Pereira *et al.* 2015). Su prevalencia es mayor al 50% de los adultos mayores entre los 60 a 65 años, siendo principalmente afectada la rodilla con una incidencia de 240/100,000 personas/año asegura Figueroa y colaboradores (2015). En México la OA, es una de las primeras 10 causas de incapacidad total, con una prevalencia del 10.5%, presentándose mayormente en mujeres que en hombres (Espinosa *et al.* 2018).

El estrés oxidativo es un factor que está involucrado en OA, ya que EROS provoca oxidación de proteínas, lípidos e incluso daños en el ADN, provocando un deterioro en el cartílago articular y en consecuencia el agotamiento de grupos -SH (Zahan *et al.* 2020). Estos grupos -SH están presentes en la L-Cisteína, que compone a moléculas de mayor tamaño que funcionan como antioxidantes para contrarrestar a EROS y otros radicales libres y mantienen la homeostasis óxido-reducción (Agan *et al.* 2019), si bien, el recuento de tioles como medida clínica del estrés oxidativo en sangre (Jones & Liang. 2009), esta podría presentarse como un posible biomarcador de la etapa en la que se encuentra OA en el líquido sinovial y como una alternativa a las técnicas existentes que requieren o personal especializado o son imprecisos (Cámara *et al.* 2020).

Metodología:

Revisión bibliográfica

Se emplearán diferentes bases de datos como: PubChem, PubMed y Google Académico para la búsqueda de artículos o documentos que brinden el conocimiento de la importancia de la OA y su relación con la determinación de tioles totales como indicadores de estrés oxidante.

Validación del ensayo de la determinación tioles totales en líquido sinovial

Se elaborará un procedimiento de validación del método siguiendo los requisitos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013, para la evaluación de su linealidad, exactitud, precisión, precisión intermedia y estabilidad.

1. Validación del método de Ellman

1.1. Linealidad y repetibilidad

La validación se realizó como está indicado en el **ANEXO 1** en el que se llevaron a cabo 3 curvas de calibración por tres días consecutivos con seis punto (sin contar el blanco) con una solución estándar de L-cisteína 250 μM , a partir de la cual se hicieron diluciones que van de los 5 hasta los 200 μM . Para la cuantificación se empleó un lector de placa UV-Vis (BioTek mod. Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer) a una absorbancia de 412 nm (Hu. 1994), se calculó el coeficiente de correlación cuidando que fuera ≥ 0.99 .

1.2. Precisión y exactitud

Se midieron tres concentraciones muestra control baja, media y alta (MCB, MCM y MCA respectivamente) incluidas en el intervalo de la curva, pero diferente de los puntos de calibración por quintuplicado por tres días consecutivos y se calculó la desviación absoluta, la cual debe ser $< 15\%$ en cada concentración contra una regresión lineal en las que se utilizaron las tres curvas de calibración preparadas en su día respectivo.

1.3. Límite inferior de cuantificación

Para su evaluación se hizo un decuplicado en el primer día de la validación, esperando un coeficiente de variación (CV) y desviación absoluta (DA) menor al 20%

1.4. Estabilidad de la muestra

1.4.1. Estabilidad 24 horas

Se evaluó la estabilidad de la L-cisteína almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas (día único) en los niveles MCB, MC, y MCA por quintuplicado. Si el valor de CV y DA obtenidos en la prueba eran menor 15%, se consideró al analito como estable.

1.4.2. Estabilidad a corto plazo

Se evaluó la estabilidad de la L-cisteína almacenada a 4°C durante 15 días con muestreos cada 5 días en los niveles MCB, MCM y MCA por quintuplicado. Se considera que la molécula es estable si el CV y su DA es menos a 15%.

1.4.3. Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la estabilidad de la L-cisteína almacenada a -30°C durante 3 meses con muestreos cada mes en los niveles MCB, MCM y MCA por quintuplicado en los que el CV Y DA < 15%.

1.4.4. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó la estabilidad de la L-cisteína almacenada a temperatura de congelación y luego descongeladas a T.A por tres días consecutivos, siendo en total tres ciclos de congelación-descongelación, con muestreos en los niveles MCB, MCM y MCA por quintuplicado. Esperando que el CV y la DA sean menores al 15%.

2. Ensayo para la determinación de tioles totales

Para la determinación de tioles totales se empleó una variación del método desarrollado por Hu, (1994) en el que se hizo una relación 1:20 de solución amortiguadora que contiene tris(hidroximetil)aminometano (TRISbas) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ajustada a pH 8.5 (0.25 mol/L TRISbas, 20 mmol/L EDTA): líquido sinovial. La muestra se preparó a manera que se ajuste en un volumen de 290 µL por pocillo en una placa de polipropileno transparente de 96 pozos (**ANEXO 1**), posteriormente, se agregaron 10 µL de solución stock de 5, 5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB, 20 mmol/L en metanol) y se dejó reaccionar por 15 min a temperatura ambiente para finalmente se medir la absorbancia (A₂) a 412 nm en espectrofotómetro UV-Vis; de manera simultánea, se procedió a la preparación de blancos, los cuales fueron preparados exactamente igual que en las muestras,

con la diferencia de que no se agregó DTNB, sino Metanol para su lectura (A1), determinando también la absorbancia del blanco con DTNB (B). El total de grupos SH se calculará con la siguiente ecuación.

$$(A2 - A1 - B)1570 \mu\text{mol/L}$$

La concentración de grupos sulfhídricos será calculada usando L-Cisteína como fuente de grupos sulfhídricos. Los resultados serán reportados como $\mu\text{mol/L}$.

3. Validación del método de BCA

3.1. Linealidad y repetibilidad

La validación se realizó como está indicado en el **ANEXO 2** en el que se llevaron a cabo 3 curvas de calibración por tres días consecutivos con seis puntos (sin contar el blanco) con una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, de la cual se hicieron diluciones que van de los 0.05 hasta los $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para la cuantificación se empleó un lector de placa UV-Vis (BioTek Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer) a una absorbancia de 562 nm (Noble & Bailey. 2009), se calculó el coeficiente de correlación cuidando que fuera ≥ 0.99 .

3.2. Precisión y exactitud

Se realizó la lectura de tres niveles de concentración de muestra control; baja, media y alta (MCB, MCM y MCA respectivamente) por quintuplicado durante tres días y, se calcularon los coeficientes de variación (CV) y las desviaciones absolutas (DA) evaluado que tuvieran un valor menor al 15% por cada concentración.

3.3. Límite inferior de cuantificación

Se hizo la medición por decuplicado del primer punto de la curva de calibración, el primer día de la validación, estableciendo un valor de CV y $DA < 20\%$ como límite para considerarlo adecuado.

3.4. Estabilidad de la muestra

3.4.1. Estabilidad 24 horas

Se evaluó la estabilidad de BSA almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas (día único) en los niveles MCB, MC, y MCA por quintuplicado. Si el valor de CV y DA obtenidos en la prueba eran menor 15%, se consideró al analito como estable.

3.4.2. Estabilidad a corto plazo

Se evaluó la estabilidad de BSA almacenada a 4°C durante 15 días con muestreos cada 5 días en los niveles MCB, MCM y MCA por quintuplicado. Si el valor de CV y DA obtenidos en la prueba eran < 15%, se consideró al analito como estable.

3.4.3. Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la estabilidad de BSA almacenada a -30°C durante 3 meses con muestreos cada mes en los niveles MCB, MCM y MCA por quintuplicado, evaluado como límite para considerar al analito estable, valores menores al 15% de CV y DA.

3.4.4. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó la estabilidad de BSA almacenada a temperatura de congelación y luego descongeladas a T.A por tres días consecutivos, siendo en total tres ciclos de congelación-descongelación, con muestreos en los niveles MCB, MCM y MCA por quintuplicado esperando que los valores de CV y DA fueran <15%.

4. Ensayo de proteínas

Para la realización de la validación se llevó a cabo la metodología descrita en el **ANEXO 2** donde en tres días consecutivos, se hicieron 3 curvas de calibración, con seis puntos, sin contar el blanco, con una solución estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) en agua desionizada, a una concentración de 0.5 mg/mL, de la que se hicieron diluciones que van de los 0.05 a 0.3 µg/µL; las muestras y el blanco se realizaron, de manera en la que el volumen por pocillo debe ser de 150 µL, en una placa de polipropileno transparente de 96 pozos (**ANEXO 2**). Una vez añadidos los puntos de la curva a la placa, se proceden a añadir 150 µL de la solución de ácido bicinconínico (BCA) y CuSO₄ al 4% en una relación 50:1 y se dejó incubar por 40 min a T.A., para finalmente leer la absorbancia en un lector de placas UV-Vis a 562 nm.

5. Resultados y discusión

5.1. Validación de método de Ellman

El método se validó mediante la evaluación de la linealidad, límite inferior de cuantificación, precisión, repetibilidad, exactitud y estabilidad según lo establecido en la NOM-177.

5.1.1. Linealidad, repetibilidad, precisión y exactitud

En los tres días de validación se puede observar que el método es lineal, lo cual es respaldado por el coeficiente de correlación >0.99 y con pendientes e interceptos similares entre sí por tres días consecutivos en tres curvas, indicando que los datos son confiables para determinar la concentración de tioles.

Tabla 1. Datos de las curvas y coeficientes de correlación (R^2) (tioles).

Día	Curva	Intercepto	Pendiente	coeficiente de correlación
1	1			0.9997
1	2	0.0579	0.0168	0.9998
1	3			0.9999
2	4			0.9998
2	5	0.0637	0.0163	0.9997
2	6			0.9999
3	7			0.9996
3	8	0.0591	0.0171	0.9993
3	9			0.9994

Es perceptible, que durante los tres días de la validación, el método demostró ser lineal al verse los coeficientes de correlación, y los interceptos con sus pendientes, los cuales no fueron muy distintos entre sí (**Tabla 1**).

Tabla 2. Límite inferior de cuantificación (LIC) (tioles).

Parámetro	LIC
	4.9439
	4.5594
	5.2322
	5.1361
Concentración μM	5.2322
	5.1361
	5.2322
	5.2322
	5.0400
	4.9439
Promedio	5.0688
Desviación estándar	0.2128
CV	4.1974
Valor esperado	5
Desviación absoluta	1.3770

Para la medición del LIC se hizo un decuplicado en el primer día de la validación (**Tabla 2**), resultando con valores de CV y DA inferiores al 20%.

Tabla 3. Repetibilidad, reproducibilidad y precisión en concentraciones baja, media y alta en μM (tiales).

Día	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA
			7.1686			38.1320			144.6387
			6.8888			38.8781			145.1982
			6.9820			39.0646			147.9961
			7.0753			39.3444			146.4107
			6.9820			37.1061			146.2241
		7.1686	7.7313		38.1320	37.5271		144.6387	142.7738
		6.8888	7.7313		38.8781	38.5844		145.1982	142.1971
Concentración μM		6.9820	7.4429		39.0646	39.1611		147.9961	142.6776
		7.0753	7.2507		39.3444	38.3921		146.4107	142.6776
		6.9820	7.3468		37.1061	37.9116		146.2241	144.8883
	7.1686	7.7313	6.5591	38.1320	37.5271	36.9049	144.6387	142.7738	143.4830
	6.8888	7.7313	7.1109	38.8781	38.5844	38.2843	145.1982	142.1971	143.8508
	6.9820	7.4429	7.9385	39.0646	39.1611	38.2843	147.9961	142.6776	144.4945
	7.0753	7.2507	8.1224	39.3444	38.3921	38.4682	146.4107	142.6776	144.4026
	6.9820	7.3468	7.6626	37.1061	37.9116	38.6521	146.2241	144.8883	144.8623
Promedio	7.0193	7.2600	7.3329	38.5050	38.4101	38.3130	146.0936	144.5682	144.4517
Desviación estándar	0.1063	0.3019	0.4326	0.9018	0.7394	0.7141	1.2899	1.9546	1.6034
CV	1.5149	4.1578	5.8995	2.3421	1.9251	1.8638	0.8830	1.3520	1.1100
Valor esperado	7.5	7.5	7.5	37.5	37.5	37.5	150	150	150
Desviación absoluta	-6.4088	-3.2006	-2.2284	2.6801	2.4270	2.1680	-2.6043	-3.6212	-3.6989

Durante los tres días de la validación se realizaron quintuplicados de tres puntos de control (MCB, MCM y MCA) y se observó que el método fue repetible cuando se calculó el CV y la DA; y reproducible cuando se vio también los CV y DA de los días siguientes, siendo de

valores inferiores al 15% que se indica en la NOM-177, además, también viendo los CV y DA el método demostró ser también exacto y preciso (**Tabla 3**).

5.1.2. Estabilidad

Tabla 4. Estabilidad de 24 horas en concentraciones baja, media y alta en μM a T.A. (tiales).

Día	CONTROL	24 H	CONTROL	24 H	CONTROL	24 H	
Parámetro	MCB	MCB	MCM	MCM	MCA	MCA	
Concentración μM		7.1686		38.1320		144.6387	
			6.8888		38.8781		145.1982
			6.9820		39.0646		147.9961
			7.0753		39.3444		146.4107
			6.9820		37.1061		146.2241
		7.1686	5.0235	38.1320	38.8781	144.6387	145.3848
		6.8888	6.6090	38.8781	37.5724	145.1982	149.2086
		6.9820	7.5416	39.0646	37.5724	147.9961	146.7837
		7.0753	6.1427	39.3444	38.9713	146.4107	149.3018
		6.9820	7.6349	37.1061	38.7848	146.2241	147.9029
Promedio	7.0193	6.8048	38.5050	38.4304	146.0936	146.9049	
Desviación estándar	0.1063	0.7570	0.9018	0.7726	1.2899	1.6439	
CV	1.5149	11.1240	2.3421	2.0103	0.8830	1.1190	
Valor esperado	7.5	7.5	37.5	37.5	150	150	
Desviación absoluta	-6.4088	-9.2689	2.6801	2.4811	-2.6043	-2.0634	

Para la estabilidad de 24 horas, se apreció que en base al CV y DA, no se rebasa el 15% indicado por la norma, lo cual también nos demuestra que la solución es estable y puede mantenerse por este periodo (**Tabla 4**).

Tabla 5. Estabilidad de los ciclos de congelación/descongelación en concentraciones baja, media y alta en μM a T.A. (tiales).

Día	CONTROL	1	2	3	CONTROL	1	2	3	CONTROL	1	2	3	
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA	MCA	
Concentración μM				7.1686				38.1320				144.6387	
				6.8888				38.8781				145.1982	
				6.9820				39.0646				147.9961	
				7.0753				39.3444				146.4107	
				6.9820				37.1061				146.2241	
				7.1686	6.5157			38.1320	40.0905		144.6387	153.5919	
				6.8888	7.6349			38.8781	40.7433		145.1982	152.1930	
				6.9820	7.8214			39.0646	40.6501		147.9961	154.7111	
				7.0753	7.6349			39.3444	41.3029		146.4107	152.4728	
				6.9820	7.7281			37.1061	40.9299		146.2241	149.2086	
			7.1686	6.5157	8.1157		38.1320	40.0905	38.7766		144.6387	153.5919	
			6.8888	7.6349	7.6351		38.8781	40.7433	38.7766		145.1982	152.1930	
			6.9820	7.8214	8.1157		39.0646	40.6501	39.3533		147.9961	154.7111	
			7.0753	7.6349	7.7313		39.3444	41.3029	40.0261		146.4107	152.4728	
			6.9820	7.7281	8.3079		37.1061	40.9299	39.6417		146.2241	149.2086	
		7.1686	6.5157	8.1157	6.0993	38.1320	40.0905	38.7766	31.6634	144.6387	153.5919	144.7922	
		6.8888	7.6349	7.6351	6.1913	38.8781	40.7433	38.7766	31.3875	145.1982	152.1930	117.9759	
		6.9820	7.8214	8.1157	6.2833	39.0646	40.6501	39.3533	31.6634	147.9961	154.7111	145.1766	
		7.0753	7.6349	7.7313	6.0993	39.3444	41.3029	40.0261	31.7553	146.4107	152.4728	105.2886	
		6.9820	7.7281	8.3079	6.1913	37.1061	40.9299	39.6417	31.8473	146.2241	149.2086	145.9456	
	Promedio	7.0193	7.2432	7.4892	7.1601	38.5050	39.6242	39.5211	37.5566	146.0936	149.2645	143.4549	137.4847
	Desviación estándar	0.1063	0.4348	0.5239	0.7385	0.9018	1.3565	1.1362	3.6254	1.2899	3.7147	13.5713	0.2460
	CV	1.5149	6.0027	6.9948	10.3143	2.3421	3.4234	2.8749	9.6532	0.8830	2.4887	9.4603	0.1789
	Valor esperado	7.5	7.5	7.5	7.5	37.5	37.5	37.5	37.5	150	150	150	150
Desviación absoluta	-6.4088	-3.4244	-0.1445	-4.5320	2.6801	5.6645	5.3895	0.1511	-2.6043	-0.4903	-4.3634	-8.3435	

Para el ciclado de congelación/descongelación (**Tabla 5**), la L-cisteína demostró que existe una tendencia a la degradación, pero, esto no rebasó el 15% establecido por la NOM-177, lo cual indicó que es posible congelar y descongelar la muestra sin ningún problema por tres días consecutivos.

Tabla 6. Estabilidad a corto en concentraciones baja, media y alta en μM a 4°C (tiales).

Día	CONTROL	5	10	15	CONTROL	5	10	15	CONTROL	5	10	15	
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA	MCA	
Concentración μM				7.1686				38.1320				144.6387	
				6.8888				38.8781				145.1982	
				6.9820				39.0646				147.9961	
				7.0753				39.3444				146.4107	
				6.9820				37.1061				146.2241	
				7.1686	6.1124			38.1320	35.5245		144.6387	139.5846	
				6.8888	6.0264			38.8781	36.0405		145.1982	140.1866	
				6.9820	6.6284			39.0646	35.4385		147.9961	140.5306	
				7.0753	6.2844			39.3444	36.5565		146.4107	141.4766	
				6.9820	6.8864			37.1061	35.0945		146.2241	140.1866	
			7.1686	6.1124	7.0094		38.1320	35.5245	36.9412		144.6387	139.5846	
			6.8888	6.0264	6.8085		38.8781	36.0405	37.5439		145.1982	140.1866	
			6.9820	6.6284	6.2058		39.0646	35.4385	38.3474		147.9961	140.5306	
			7.0753	6.2844	7.1098		39.3444	36.5565	37.1421		146.4107	141.4766	
			6.9820	6.8864	7.0094		37.1061	35.0945	38.3474		146.2241	140.1866	
		7.1686	6.1124	7.0094	6.6367	38.1320	36.9412	36.9412	32.8901	144.6387	145.3186	145.3186	
		6.8888	6.0264	6.8085	6.4667	38.8781	37.5439	37.5439	32.4653	145.1982	142.7071	142.7071	
		6.9820	6.6284	6.2058	6.5517	39.0646	38.3474	38.3474	32.9751	147.9961	142.4058	142.4058	
		7.0753	6.2844	7.1098	6.3818	39.3444	37.1421	37.1421	32.7202	146.4107	141.2005	141.2005	
		6.9820	6.8864	7.0094	6.6367	37.1061	38.3474	38.3474	32.7202	146.2241	144.3142	144.3142	
	Promedio	7.0193	6.7035	6.7452	6.6926	38.5050	38.0847	37.3001	36.1636	146.0936	144.6414	143.2253	139.5457
	Desviación estándar	0.1063	0.4172	0.3920	0.3529	0.9018	0.8669	1.3769	2.3417	1.2899	2.0641	2.6785	6.9433
	CV	1.5149	6.2237	5.8117	5.2734	2.3421	2.2761	3.6914	6.4754	0.8830	1.4270	1.8701	4.9756
	Valor esperado	7.5	7.5	7.5	7.5	37.5	37.5	37.5	37.5	150	150	150	150
Desviación absoluta	-6.4088	-10.6203	-10.0642	-10.7658	2.6801	1.5593	-0.5331	-3.5637	-2.6043	-3.5724	-4.5165	-6.9695	

La estabilidad a corto plazo pasó la prueba, debido a que se mantuvo con un CV y DA inferiores al 15%, entendiéndose que no hay problema alguno al utilizar las muestras hasta 15 días después de su almacenamiento a una temperatura de 4°C (Tabla 6).

Tabla 7. Estabilidad a largo plazo en concentraciones baja, media y alta en µM a -30°C (tiales).

Día	CONTROL	30	60	90	CONTROL	30	60	90	CONTROL	30	60	90	
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA	MCA	
Concentración µM				7.1686				38.1320				144.6387	
				6.8888				38.8781				145.1982	
				6.9820				39.0646				147.9961	
				7.0753				39.3444				146.4107	
				6.9820				37.1061				146.2241	
			7.1686	6.1544			38.1320	35.0608			144.6387	141.1328	
			6.8888	6.8076			38.8781	36.9389			145.1982	139.6630	
			6.9820	9.1757			39.0646	35.2241			147.9961	140.5612	
			7.0753	6.8893			39.3444	37.1022			146.4107	139.0914	
			6.9820	6.7260			37.1061	36.5306			146.2241	142.4393	
			7.1686	6.1544	6.8795		38.1320	35.0608	36.2085		144.6387	141.1328	143.2111
			6.8888	6.8076	6.7989		38.8781	36.9389	36.2085		145.1982	139.6630	144.0974
			6.9820	9.1757	6.7989		39.0646	35.2241	36.2085		147.9961	140.5612	144.3391
			7.0753	6.8893	6.8795		39.3444	37.1022	36.7725		146.4107	139.0914	147.1592
			6.9820	6.7260	6.8795		37.1061	36.5306	36.5308		146.2241	142.4393	145.0643
		7.1686	6.1544	6.8795	6.4502	38.1320	35.0608	36.2085	36.4402	144.6387	141.1328	143.2111	141.3219
		6.8888	6.8076	6.7989	6.3669	38.8781	36.9389	36.2085	36.3569	145.1982	139.6630	144.0974	143.9877
		6.9820	9.1757	6.7989	6.3669	39.0646	35.2241	36.2085	36.5235	147.9961	140.5612	144.3391	141.2386
		7.0753	6.8893	6.8795	6.5335	39.3444	37.1022	36.7725	35.9404	146.4107	139.0914	147.1592	141.9884
		6.9820	6.7260	6.8795	6.6168	37.1061	36.5306	36.5308	36.4402	146.2241	142.4393	145.0643	142.7381
	Promedio	7.0193	7.0850	7.0057	6.8710	38.5050	37.3382	37.0207	36.8506	146.0936	143.3355	143.8151	143.4251
	Desviación estándar	0.1063	0.7851	0.6405	0.6018	0.9018	1.5123	1.3058	1.1658	1.2899	3.1542	2.7426	2.5094
	CV	1.5149	11.0817	9.1430	8.7579	2.3421	4.0503	3.5272	3.1636	0.8830	2.2006	1.9070	1.7496
	Valor esperado	7.5	7.5	7.5	7.5	37.5	37.5	37.5	37.5	150	150	150	150
Desviación absoluta	-6.4088	-5.5339	-6.5903	-8.3866	2.6801	-0.4315	-1.2781	-1.7317	-2.6043	-4.4430	-4.1233	-4.3833	

En el caso de la estabilidad a largo plazo a -30°C (Tabla 7), la L-cisteína se mantuvo por debajo del 15% durante los 90 días de estabilidad, apreciándose esto en el CV y DA.

Como se puede observar en la validación, no se sobrepasó el límite máximo indicado por la NOM-177, sin comprometerse la exactitud y precisión; y siendo este método repetible y reproducible. Por lo cuál el método fue completamente viable para los ensayos de caracterización de este proyecto. En cuanto a la estabilidad, igualmente, no se sobrepasó en ningún momento el límite máximo, esto indicó que las muestras almacenadas que contengan tiales son estables hasta por 90 días bajo condiciones de congelación, 15 días a temperatura baja y 24 horas a temperatura ambiente.

5.2. Validación de método de BCA

Al igual que el método anterior, este otro método se validó mediante la evaluación de la linealidad, límite inferior de cuantificación, precisión, repetibilidad, exactitud y estabilidad según lo establecido en la NOM-177.

5.2.1. Linealidad, repetibilidad, precisión y exactitud

Tabla 8. Datos de las curvas y coeficientes de correlación (R^2) (proteínas).

Día	Curva	Intercepto	Pendiente	coeficiente de correlación
1	1			0.9981
1	2	0.0745	2.4412	0.9979
1	3			0.9940
2	4			0.9991
2	5	0.0922	2.7549	0.9991
2	6			0.9973
3	7			0.9989
3	8	0.0860	2.6433	0.9990
3	9			0.9983

Se observó que durante los tres días de la validación, el método se mantuvo lineal, obteniéndose coeficientes de correlación de 0.99 o superiores en las tres curvas de calibración de los tres días, y no solo eso, sino que también se obtuvieron interceptos y pendientes similares entre si (**Tabla 8**).

Tabla 9. Límite inferior de cuantificación (LIC) (proteínas).

Parámetro	LIC
	0.0439
	0.0431
	0.0414
	0.0406
Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.0435
	0.0419
	0.0378
	0.0398
	0.0419
	0.0378
Promedio	0.0412
Desviación estándar	0.0022
CV	5.3084
Valor esperado	0.05
Desviación absoluta	-17.6738

El límite inferior de cuantificación (**Tabla 9**) mantuvo sus niveles por debajo de 20% tanto para su CV como su DA.

Tabla 10. Precisión y repetibilidad en concentraciones baja, media y alta en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (proteínas).

Día	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA
			0.0717			0.1770			0.2622
			0.0758			0.1753			0.2646
			0.0750			0.1774			0.2695
			0.0717			0.1749			0.2700
			0.0762			0.1749			0.2781
		0.0717	0.0729		0.1770	0.1803		0.2622	0.2733
		0.0758	0.0743		0.1753	0.1778		0.2646	0.2751
Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$		0.0750	0.0740		0.1774	0.1832		0.2695	0.2740
		0.0717	0.0722		0.1749	0.1810		0.2700	0.2700
		0.0762	0.0732		0.1749	0.1821		0.2781	0.2747
	0.0717	0.0729	0.0735	0.1770	0.1803	0.1741	0.2622	0.2733	0.2642
	0.0758	0.0743	0.0731	0.1753	0.1778	0.1756	0.2646	0.2751	0.2714
	0.0750	0.0740	0.0712	0.1774	0.1832	0.1794	0.2695	0.2740	0.2687
	0.0717	0.0722	0.0735	0.1749	0.1810	0.1613	0.2700	0.2700	0.2702
	0.0762	0.0732	0.0716	0.1749	0.1821	0.1821	0.2781	0.2747	0.2638
Promedio	0.0741	0.0737	0.0733	0.1759	0.1784	0.1771	0.2689	0.2711	0.2700
Desviación estándar	0.0022	0.0016	0.0015	0.0012	0.0031	0.0053	0.0061	0.0049	0.0047
CV	2.9884	2.2176	2.0878	0.6709	1.7239	2.9947	2.2816	1.8144	1.7342
Valor esperado	0.075	0.075	0.075	0.175	0.175	0.175	0.275	0.275	0.275
Desviación absoluta	-1.2402	-1.7448	-2.2331	0.5163	1.9452	1.2037	-2.2222	-1.4027	-1.8257

Se llevó a cabo un quintuplicado de los tres niveles de concentración (**Tabla 10**), y acorde a los límites de la norma, todos los niveles en los tres días consecutivos obtuvieron un CV y DA menores a 15%, indicando que el método ya siendo lineal, también es repetible y reproducible.

5.2.2. Estabilidad

Tabla 11. Estabilidad de 24 horas en concentraciones baja, media y alta en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a T.A. (proteínas).

Día	CONTROL	24 H	CONTROL	24 H	CONTROL	24 H	
Parámetro	MCB	MCB	MCM	MCM	MCA	MCA	
Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		0.0717		0.1770		0.2622	
		0.0758		0.1753		0.2646	
		0.0750		0.1774		0.2695	
		0.0717		0.1749		0.2700	
		0.0762		0.1749		0.2781	
		0.0717	0.0716	0.1770	0.1866	0.2622	0.2755
		0.0758	0.0769	0.1753	0.1738	0.2646	0.2801
		0.0750	0.0777	0.1774	0.1609	0.2695	0.2725
		0.0717	0.0765	0.1749	0.1828	0.2700	0.2733
		0.0762	0.0777	0.1749	0.1862	0.2781	0.2759
Promedio	0.0741	0.0751	0.1759	0.1770	0.2689	0.2722	
Desviación estándar	0.0022	0.0025	0.0012	0.0074	0.0061	0.0057	
CV	2.9884	3.3081	0.6709	4.1838	2.2816	2.0967	
Valor esperado	0.075	0.075	0.175	0.175	0.275	0.275	
Desviación absoluta	-1.2402	0.0954	0.5163	1.1346	-2.2222	-1.0299	

En la estabilidad de 24 horas (**Tabla 11**) el CV y DA se mantienen por debajo del 15% que establece la norma, por lo cual la solución de BSA es estable a una temperatura ambiente, se apreció que en base al CV y DA, no se rebasa el 15% indicado por la norma, lo cual también nos demuestra que la solución es estable y puede mantenerse por este periodo.

Tabla 12. Estabilidad de los ciclos de congelación/descongelación en concentraciones baja, media y alta en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a T.A. (proteínas).

Día	CONTROL	1	2	3	CONTROL	1	2	3	CONTROL	1	2	3	
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA	MCA	
Concentración µg/µL				0.0717				0.1770				0.2622	
				0.0758				0.1753				0.2646	
				0.0750				0.1774				0.2695	
				0.0717				0.1749				0.2700	
				0.0762				0.1749				0.2781	
			0.0717	0.0846				0.1770	0.1770			0.2622	0.2622
			0.0758	0.0793				0.1753	0.1753			0.2646	0.2646
			0.0750	0.0834				0.1774	0.1774			0.2695	0.2695
			0.0717	0.0744				0.1749	0.1749			0.2700	0.2700
			0.0762	0.0825				0.1749	0.1749			0.2781	0.2781
		0.0717	0.0846	0.0769		0.1770	0.1803	0.1803		0.2622	0.2733	0.2733	
		0.0758	0.0793	0.0696		0.1753	0.1778	0.1778		0.2646	0.2751	0.2751	
		0.0750	0.0834	0.0736		0.1774	0.1832	0.1832		0.2695	0.2740	0.2740	
		0.0717	0.0744	0.0722		0.1749	0.1810	0.1810		0.2700	0.2700	0.2700	
		0.0762	0.0825	0.0711		0.1749	0.1821	0.1821		0.2781	0.2747	0.2747	
		0.0717	0.0846	0.0769	0.0743	0.1770	0.1803	0.1741	0.1821	0.2622	0.2733	0.2642	0.1677
		0.0758	0.0793	0.0696	0.0735	0.1753	0.1778	0.1756	0.1454	0.2646	0.2751	0.2714	0.1711
		0.0750	0.0834	0.0736	0.0758	0.1774	0.1832	0.1794	0.1707	0.2695	0.2740	0.2687	0.2608
		0.0717	0.0744	0.0722	0.0777	0.1749	0.1810	0.1613	0.1677	0.2700	0.2700	0.2702	0.2623
		0.076199951	0.0825	0.0711	0.0739	0.1749	0.1821	0.1821	0.1711	0.2781	0.2747	0.2638	0.2664
	Promedio	0.0741	0.0774	0.0759	0.0756	0.1759	0.1784	0.1771	0.1750	0.2689	0.2711	0.2700	0.2767
Desviación estándar	0.0022	0.0047	0.0047	0.0041	0.0012	0.0031	0.0053	0.0080	0.0061	0.0049	0.0047	0.2460	
CV	2.9884	6.1129	6.1929	5.4533	0.6709	1.7239	2.9947	4.5870	2.2816	1.8144	1.7342	88.9236	
Valor esperado	0.075	0.075	0.075	0.075	0.175	0.175	0.175	0.175	0.275	0.275	0.275	0.275	
Desviación absoluta	-1.2402	3.2658	1.1370	0.8574	0.5163	1.9452	1.2037	0.0158	-2.2222	-1.4027	-1.8257	0.6025	

En los ciclados de congelación/descongelación (Tabla 12), el CV y DA se mantuvieron por debajo del 15%, lo cual indicó que el BSA es estable bajo múltiples ciclos de manera consecutiva para los tres niveles de concentración.

Tabla 13. Estabilidad a corto en concentraciones baja, media y alta en µg/µL a 4°C (Proteínas).

Día	CONTROL	1	2	3	CONTROL	1	2	3	1	CONTROL	2	3	
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA	MCA	
Concentración µg/µL				0.0717				0.1770				0.2622	
				0.0758				0.1753				0.2646	
				0.0750				0.1774				0.2695	
				0.0717				0.1749				0.2700	
				0.0762				0.1749				0.2781	
			0.0717	0.0651				0.1770	0.1683			0.2622	0.2624
			0.0758	0.0675				0.1753	0.1720			0.2646	0.2611
			0.0750	0.0675				0.1774	0.1687			0.2695	0.2644
			0.0717	0.0680				0.1749	0.1683			0.2700	0.2681
			0.0762	0.0597				0.1749	0.1699			0.2781	0.2644
		0.0717	0.0651	0.0699		0.1770	0.1683	0.1726	0.1726		0.2622	0.2624	0.2682
		0.0758	0.0675	0.0687	0.0718	0.1753	0.1720	0.1714	0.1723	0.2646	0.2611	0.2691	0.2644
		0.0750	0.0675	0.0699	0.0680	0.1774	0.1687	0.1764	0.1769	0.2695	0.2644	0.2687	0.2682
		0.0717	0.0680	0.0708		0.1749	0.1683	0.1772	0.1689	0.2700	0.2681	0.2636	0.2615
		0.0762	0.0597	0.0699		0.1749	0.1699	0.1781	0.1798	0.2781	0.2644	0.2695	0.2611
		0.0741	0.0698	0.0698	0.0699	0.1759	0.1727	0.1735	0.1740	0.2689	0.2665	0.2669	0.2661
	Desviación estándar	0.0022	0.0052	0.0042	0.0037	0.0012	0.0037	0.0036	0.0039	0.0061	0.0051	0.0043	0.0043
	CV	2.9884	7.5152	6.0518	5.3023	0.6709	2.1250	2.0473	2.2465	2.2816	1.9211	1.6279	1.6039
	Valor esperado	0.075	0.075	0.075	0.075	0.175	0.175	0.175	0.175	0.275	0.275	0.275	0.275
	Desviación absoluta	-1.2402	-6.9038	-6.8890	-6.7804	0.5163	-1.3410	-0.8675	-0.5609	-2.2222	-3.0917	-2.9320	-3.2516

La estabilidad a corto plazo (Tabla 13) pasó la prueba al mantenerse con un CV y DA inferiores al 15% de los tres niveles de concentración y no presentar una tendencia a la degradación, mostrando que el BSA se mantiene viable hasta los 15 días a 4°C.

Tabla 14. Estabilidad a largo plazo en concentraciones baja, media y alta en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a -30°C (Proteínas).

Día	CONTROL	1	2	3	CONTROL	1	2	3	1	CONTROL	2	3
Parámetro	MCB	MCB	MCB	MCB	MCM	MCM	MCM	MCM	MCA	MCA	MCA	MCA
				0.0717				0.1770				0.2622
				0.0758				0.1753				0.2646
				0.0750				0.1774				0.2695
				0.0717				0.1749				0.2700
				0.0762				0.1749				0.2781
			0.0717	0.0724			0.1770	0.1731			0.2622	0.2678
			0.0758	0.0716			0.1753	0.1785			0.2646	0.2653
			0.0750	0.0716			0.1774	0.1781			0.2695	0.2661
			0.0717	0.0708			0.1749	0.1793			0.2700	0.2728
			0.0762	0.0641			0.1749	0.1793			0.2781	0.2716
Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$		0.0717	0.0724	0.0728		0.1770	0.1731	0.1795		0.2622	0.2678	0.2662
		0.0758	0.0716	0.0738		0.1753	0.1785	0.1740		0.2646	0.2653	0.2667
		0.0750	0.0716	0.0647		0.1774	0.1781	0.1805		0.2695	0.2661	0.2617
		0.0717	0.0708	0.0748		0.1749	0.1793	0.1700		0.2700	0.2728	0.2667
		0.0762	0.0641	0.0708		0.1749	0.1793	0.1735		0.2781	0.2716	0.2662
	0.0717	0.0724	0.0728	0.0842	0.1770	0.1731	0.1795	0.1596	0.2622	0.2678	0.2662	0.2661
	0.0758	0.0716	0.0738	0.0804	0.1753	0.1785	0.1740	0.1660	0.2646	0.2653	0.2667	0.2755
	0.0750	0.0716	0.0647	0.0842	0.1774	0.1781	0.1805	0.1596	0.2695	0.2661	0.2617	0.2550
	0.0717	0.0708	0.0748	0.0816	0.1749	0.1793	0.1700	0.1617	0.2700	0.2728	0.2667	0.2708
	0.0762	0.0641	0.0708	0.0825	0.1749	0.1793	0.1735	0.1634	0.2781	0.2716	0.2662	0.2627
Promedio	0.0741	0.0721	0.0718	0.0745	0.1759	0.1768	0.1763	0.1728	0.2689	0.2688	0.2677	0.2673
Desviación estándar	0.0022	0.0034	0.0035	0.0057	0.0012	0.0021	0.0030	0.0070	0.0061	0.0047	0.0042	0.0052
CV	2.9884	4.7483	4.8600	7.6225	0.6709	1.2027	1.6872	4.0248	2.2816	1.7301	1.5768	1.9276
Valor esperado	0.075	0.075	0.075	0.075	0.175	0.175	0.175	0.175	0.275	0.275	0.275	0.275
Desviación absoluta	-1.2402	-3.8829	-4.2050	-0.6295	0.5163	1.0135	0.7711	-1.2697	-2.2222	-2.2503	-2.6509	-2.8057

Para el caso de la estabilidad a largo plazo, al igual que los demás ensayos, se mantuvo con un CV y DA inferiores al 15% indicado por la NOM-177, y con ello se evidenció que las muestras de BSA se pueden mantener útiles hasta 90 días a -30°C sin presentar problema alguno (Tabla 14).

En la validación no se sobrepasaron los límites establecidos por la norma, resultando en un método repetible y reproducible, así como preciso y exacto. En cuanto a la estabilidad, las muestras se pudieron mantener útiles tanto a temperaturas bajas, como a temperaturas de congelación, así como para su uso a 24 horas desde su preparación.

6. Determinación de tioles en muestras de líquido sinovial de pacientes con OA

Se empleó el método de Ellman para cuantificación de tioles, en muestras de líquido sinovial de pacientes con diferentes grados de osteoartritis, obtenidas en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Debido a motivos éticos, no existió un grupo de control negativo (que no padezcan OA), sin embargo, se considera que el método y la validación permitieron caracterizar el nivel de tioles y su comparar distintos grados de OA.

Se esperaba encontrar variaciones en el equilibrio redox del líquido sinovial debido al estrés oxidante crónico que llevaría a una oxidación de los tioles presentes en las proteínas, correlacionándose un mayor daño de las articulaciones con niveles menores de tioles.

Los datos de 8 pacientes fueron descartados, dejando al estudio con 26 pacientes, pero es posible observar una tendencia entre los distintos grados. También se debe considerar seriamente, que para la determinación exacta de tioles en el líquido sinovial, es necesario usar el periodo de 15 minutos, y de ser posible, trabajar con muestras frescas y un grupo control que no padezca de OA, para prevenir sesgos ocasionados por la degradación de la matriz biológica y de la falta de datos.

Tabla 15. Relación tioles proteína en pacientes con OA por el método de Ellman.

Tioles nmol	Proteína mg	Tioles (nmol/mg proteína)	Grado
163460.1166	9479.256	17.24398166	2
214950.156	20936.444	10.26679392	3
142396.0096	24698.504	5.765369822	3
114310.5338	15635.356	7.31102853	3
244249.44	10625.128	22.98790565	3
126012.8154	19055.412	6.612967245	3
214950.156	13583.324	15.82456224	3
166785.806	15796.904	10.55813253	3
226757.66	26657.636	8.506292906	3
214263.52	24244.14	8.837744709	3
141797.536	14417.764	9.834918646	4
216762.34	20451.504	10.59884593	4
179279.942	16314.084	10.98927418	4
144736.466	18200.4	7.952378299	4
121331.9028	11360.288	10.68035448	4
294226	36139.228	8.141457809	4
184277.596	2695.072	68.37575991	4
189205.136	15806.36	11.97019023	4
86225.058	16148.364	5.339553778	4
142396.0096	8624.24	16.51113717	4
219631.068	5546.192	39.60033623	4
541609.88	28553.956	18.96794546	4
182183.767	5546.192	32.84844214	4
236752.96	9073.596	26.09251723	4
166785.806	32001.808	5.211761973	4
184524.2234	23501.488	7.851597456	4

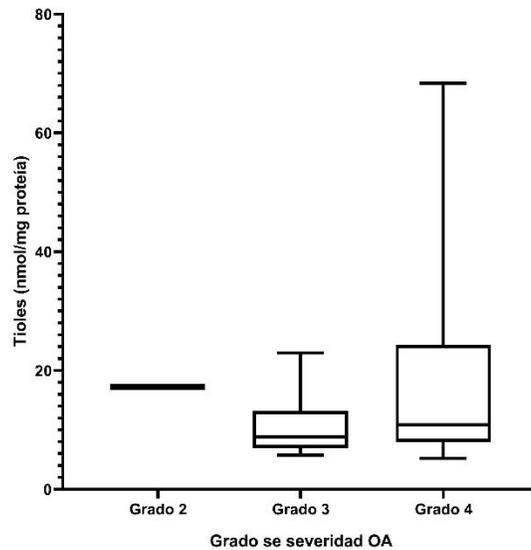


Figura 1. Diagrama de caja de concentración Tioles (nmol/mg proteína) y grado de OA.

7. Conclusión

Debido al estado en el que se encontraban las muestras (conservadas por un periodo mayor a 1 año), no fue posible encontrar una tendencia entre el grado de severidad de OA y la concentración de tioles presentes en el líquido sinovial, debido a que no se pudo diferenciar los grados entre grupos. Aunado a eso, la falta de un grupo de control negativo imposibilitó una comparación que revele si existe un descenso en la concentración de tioles en los tres grupos ya que se esperaba una disminución en la concentración de tioles según aumentaba el grado de severidad de OA al presentarse mayor daño del estrés oxidante y bajos niveles de grupos antioxidantes en el cuerpo que contengan tioles.

Los métodos para la determinación de tioles y de proteínas evaluados en este trabajo, resultaron ser lineales, repetibles, precisos y exactos, cumpliendo para la caracterización y medición; pese a las limitaciones, el método para cuantificar tioles, resulta ser una base útil y fiable para estudios de carácter exploratorio, abriéndose nuevas puertas para futuras investigaciones que requieran evaluar su nivel como un posible biomarcador en el diagnóstico de la OA en el líquido sinovial de pacientes con OA.

Lugar de realización: El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Neurofarmacología Molecular (N-010), ubicado en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS), del Departamento de Sistemas Biológicos de la Unidad Xochimilco de la UAM y con apoyo del Laboratorio de Neuroquímica ubicado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, y el laboratorio de Neurociencia Básica del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

Licenciaturas que comprende: Química Farmacéutica Biológica.

Número de participantes: Uno

Asesores responsables:

- Dra. Tomasa Veronica Barón Flores (Interno, No. Eco. 26848)
- Dr. Luis Antonio Tristán López (Externo, Ced. Prof. 12395354)

Duración y etapas:

- I. Revisión bibliográfica.
- II. Estandarización del método de determinación de tioles totales en el líquido sinovial.
- III. Validación del método.
- IV. Determinación de tioles totales en líquido sinovial.
- V. Análisis de resultados.
- VI. Elaboración del informe final del proyecto del servicio social.

Cronograma de actividades del servicio social:

CRONOGRAMA DEL SEVICIO SOCIAL						
ACTIVIDAD	2023	2024				
	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
I. Revisión bibliográfica						
II. Estandarización del método de determinación de tioles totales en el líquido sinovial						
III. Validación del método.						
IV. Determinación de tioles totales en líquido sinovial.						
V. Análisis de resultados						
VI. Elaboración del informe final del proyecto del servicio social.						

Tiempo de dedicación: Seis meses.

Criterios de evaluación: Informe final del proyecto de servicio social.

8. Referencias

1. Agan V, Celik H, Eren MA, Agan FZ, Erel O, Neselioglu S, Koyuncu I, Gonel A. An Investigation of Oxidative Stress and Thiol/Disulphide Homeostasis in Graves' Disease. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Jun 14;55(6):275. doi: 10.3390/medicina55060275. PMID: 31207925; PMCID: PMC6630526.
2. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110452. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110452. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32768946; PMCID: PMC8404686.
3. Baba SP, Bhatnagar A. ROLE OF THIOLS IN OXIDATIVE STRESS. *Curr Opin Toxicol*. 2018 Feb;7:133-139. doi: 10.1016/j.cotox.2018.03.005. Epub 2018 Mar 21. PMID: 30338308; PMCID: PMC6188637.
4. Espinosa-Morales, Rolando, Alcántar-Ramírez, Jesús, Arce-Salinas, César Alejandro, Chávez-Espina, Luis Miguel, Esquivel-Valerio, Jorge A, Gutiérrez-Gómez, Jaime José, Lanza, Laura De la, Martínez-Hernández, José Luis, Méndez-Medina, Carlos, Román, Manuel Robles-San, Santillán-Barrera, Ernesto, Torres-Roldán, Fernando, Sosa-García, Jesús Ojino, Aldrete-Velasco, Jorge, & Romero-González, Alejandra. (2018). Reunión multidisciplinaria de expertos para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. Actualización basada en evidencias. *Medicina interna de México*, 34(3), 443-476. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i3.1433>
5. Felipe Eduardo Cámara Arrigunaga, Francisco Bernadino Aguirre-Salinas, Alejandro Murillo Villarino, José Guillermo Bobadilla Lescano, Felipe Amador Martínez Escalante, Angel de Jesús Balam May, Correlación de la Escala de Kellgren-Lawrence con la Clasificación de Outerbridge en Pacientes con Gonalgia Crónica, *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, Volume 34, Issue 2, 2020, Pages 160-166, ISSN 0120-8845, <https://doi.org/10.1016/j.rccot.2020.06.012>.
6. Guillén-García, A., Hernández-Moreno, A. V., Pérez-Medina-Martínez, V., Miranda-Hernández, M. P., Pérez, N. O., López-Morales, C. A., Flores-Ortiz, L. F., Villaseñor-

- Ortega, F., & Medina-Rivero, E. (2016). Validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de tioles libres en filgrastim. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 741-748.
7. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994;233:380-5. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33044-1. PMID: 8015473.
 8. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2009 Nov 15;47(10):1329-38. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.021. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19715755; PMCID: PMC2774737.
 9. Kijowski R, Blankenbaker D, Stanton P, Fine J, De Smet A. Arthroscopic validation of radiographic grading scales of osteoarthritis of the tibiofemoral joint. *AJR Am J Roentgenol.* 2006 Sep;187(3):794-9. doi: 10.2214/AJR.05.1123. PMID: 16928947.
 10. Kohn MD, Sassoon AA, Fernando ND. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2016 Aug;474(8):1886-93. doi: 10.1007/s11999-016-4732-4. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26872913; PMCID: PMC4925407.
 11. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1862(4):576-591. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.01.003. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26769361.
 12. Li D, Xie G, Wang W. Reactive oxygen species: the 2-edged sword of osteoarthritis. *Am J Med Sci.* 2012 Dec;344(6):486-90. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3182579dc6. PMID: 22885622.
 13. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, Goldring SR, Jones G, Teichtahl AJ, Pelletier JP. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Oct 13;2:16072. doi: 10.1038/nrdp.2016.72. PMID: 27734845.
 14. Martínez Figueroa R, Martínez Figueroa C, Calvo Rodríguez R, Figueroa Poblete D. Osteoarthritis (artrosis) de rodilla, *Revista Chilena de Ortopedia y Traumatología*, Volume 56, Issue 3, 2015, Pages 45-51, ISSN 0716-4548, <https://doi.org/10.1016/j.rchot.2015.10.005>.
 15. Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463, 73–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)

16. Ozler K, Erel O, Gokalp O, Avcioglu G, Neselioglu S. Is there a relationship between dynamic thiol/disulfide homeostasis and osteoarthritis progression? *Arch Physiol Biochem.* 2022 Apr;128(2):431-437. doi: 10.1080/13813455.2019.1689274. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31738582.
17. Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis. *Acta Med Port.* 2015 Jan-Feb;28(1):99-106. doi: 10.20344/amp.5477. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25817486.
18. Xia B, Di Chen, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int.* 2014 Dec;95(6):495-505. doi: 10.1007/s00223-014-9917-9. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25311420; PMCID: PMC4747051.
19. Yang Y, Guan X. Rapid and thiol-specific high-throughput assay for simultaneous relative quantification of total thiols, protein thiols, and nonprotein thiols in cells. *Anal Chem.* 2015 Jan 6;87(1):649-55. doi: 10.1021/ac503411p. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25423115; PMCID: PMC4287829.
20. Zahan OM, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Med Pharm Rep.* 2020 Jan;93(1):12-22. doi: 10.15386/mpr-1422. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32133442; PMCID: PMC7051818.

9. Anexos

ANEXO 1

	INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ	VALORACIÓN DE TIOLES (L-CISTEÍNA) POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.
---	--	---

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 1 DE 7
--	------------------------	----------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------

CONTENIDO:

1. Objetivo
2. Alcance
3. Responsabilidades
4. Desarrollo del proceso
 - a. Abreviaciones.
 - b. Reactivos
 - c. Procedimiento
5. Referencia bibliográfica
6. Históricos de cambio

OBJETIVO:

Establecer el procedimiento y las instrucciones que debe seguir el personal para la validación de tioles por espectroscopia UV-Vis.

ALCANCE:

El presente PNO aplica para todo personal capacitado y con conocimiento comprobable en técnicas de análisis y el manejo y uso del espectrofotómetro UV-Vis; así como contar con el conocimiento de la NOM-177-SSA1-2013.

RESPONSABILIDADES:

El responsable del área debe:

- Revisar, autorizar y firmar el PNO y sus futuras modificaciones.
- Asignar la elaboración del PNO al personal correspondiente.
- Supervisar que el PNO sea elaborado y escrito por el personal asignado
- Dar a conocer el PNO al personal encargado en uso y manejo de las muestras y el espectrofotómetro.
- Supervisar el cumplimiento del PNO.

DESARROLLO DEL PROCESO:

- a) ABREVIACIONES:
- DTNB: 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico).
 - EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
 - SA: Solución amortiguadora.

Elaboró: QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco. Fecha: -/FEB/2024	Revisó: Dr. Luis Antonio Tristán López Fecha: -/FEB/2024
---	---



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 2 DE 7
-------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

- TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.
- mg: miligramo.
- mL: mililitro.
- mM: milimolar.
- Sol'n: solución.
- T.A.: temperatura ambiente.
- μ L: microlitro.
- μ M: micromolar.

a) REACTIVOS

Materiales	Reactivos	Soluciones
<ul style="list-style-type: none">• Lector de placa UV-Vis.• Micropipeta 2-20 μL.• Micropipeta 10-100 μL.• Micropipeta 100-1000 μL.• Puntillas de micropipeta.• Repipeteador.• Balanza analítica• Matraz volumétrico de 5 mL.• Matraz volumétrico de 10 mL• Tubo Eppendorf de 5 mL	<ul style="list-style-type: none">• Metanol (#12 de SOLVENTES).• DTNB (#52 de ORGÁNICOS).• EDTA (#53 de ORGÁNICOS).• TRIS (#156 de ORGÁNICOS).	<ul style="list-style-type: none">• SA de TRIS (0.25 M) y EDTA (20 mM) pH 8.5.• Solución stock de DTNB en metanol (20 mM).

b) PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SA de TRIS (0.25 M) y EDTA (20 mM) pH 8.5:

- En un matraz volumétrico de 100 mL, disolver 3.0285 g de TRIS (#156 de ORGÁNICOS), 584.48 mg de EDTA (#53 de ORGÁNICOS) en 50 mL de agua. Ajustar a pH de 8.5 con ácido clorhídrico. Llevar a volumen con agua.

Nota: En caso de ser necesario, ajustar los valores para preparar un volumen mayor de SA Tris-EDTA.

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/FEB/2024

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/FEB/2024



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

VALORACIÓN DE TIOLES
(L-CISTEÍNA) POR
ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 3 DE 7
-------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

Solución stock de DTNB en metanol (20 mM):

- En un matraz volumétrico de 10 mL, disolver 39.635 mg de DTNB (#52 de ORGÁNICOS) en 5 mL de metanol (#12 de SOLVENTES). Llevar a volumen con metanol.

Solución Stock de cisteína:

Pesar 12.116 mg de cisteína y aforar con agua desionizada en matraz volumétrico de 10mL (10,000 μ M).

Tomar 0.125 mL y aforar con agua desionizada en matraz de 5 mL (250 μ M).

Comenzar a hacer las diluciones como se indica en las tablas.

Lecturas:

Se procederá a leer las absorbancias de metanol (A1) y DTNB (A2). El blanco (B) es la absorbancia de la posición uno de la siguiente tabla.

La curva o muestras que contengan DTNB se leerán después de incubar a T.A. durante 15 minutos protegido de la luz.

Preparación de la curva de L-cisteína con Metanol (Blancos):

Posición	Concentración de la sol'n por nivel (μ M)	Vol. de muestra (μ L)	Vol. de TRIS-EDTA (μ L)	Vol. de Metanol (μ L)
1	0	0	290	10
2	5	6	284	10
3*	7.5	9	281	10
4	12.5	15	275	10
5	25	30	260	10
6*	37.5	45	245	10
7	50	60	230	10
8	100	120	170	10

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/FEB/2024

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/FEB/2024



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**VALORACIÓN DE TIOLES
(L-CISTEÍNA) POR
ESPECTROSCOPIA UV-VIS.**

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 4 DE 7
-------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

9*	150	180	110	10
10	200	240	50	10

(*) Puntos de control bajo, medio y alto.

Preparación de la curva de L-cisteína con DTNB:

Posición	Concentración de la sol'n por nivel (μM)	Vol. de muestra (μL)	Vol. de TRIS-EDTA (μL)	Vol. de DTNB 20 mM (μL)
1	0	0	290	10
2	5	6	284	10
3*	7.5	9	281	10
4	12.5	15	275	10
5	25	30	260	10
6*	37.5	45	245	10
7	50	60	230	10
8	100	120	170	10
9*	150	180	110	10
10	200	240	50	10

(*) Punto de control bajo, medio y alto.

Disposición en la placa:

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8	p9	p10	p11	p12
A	0	0	0	0	6	6	9	9	9	9	9	9
B	6	6	6	6	6	6	9	9	9	9	9	9

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/FEB/2024

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/FEB/2024



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**VALORACIÓN DE TIOLES
(L-CISTEÍNA) POR
ESPECTROSCOPIA UV-VIS.**

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 5 DE 7
-------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

C	15	15	15	15	6	6						
D	30	30	30	30	6	6	45	45	45	45	45	45
E	60	60	60	60	6	6	45	45	45	45	45	45
F	120	120	120	120	6	6						
G	240	240	240	240			180	180	180	180	180	180
H							180	180	180	180	180	180

Procesado de la curva de validación:

- Colocar en una placa de poliestireno de 96 pozos, cada punto de la curva de calibración por cuatruplicado de manera ascendente, un hexaplicado de cada punto de control y un dodecaplicado del LIC. Se deberá considerar ambas condiciones: metanol y DTNB.

NOTA 1: "B" es el promedio de los blancos de metanol sin muestra (Azul más oscuro en "Preparación de la curva de L-cisteína con Metanol")

NOTA 2: las zonas marcadas representan el hexaplicado del ciclo de congelación-descongelación o estabilidad de corto o largo plazo (3 meses).

- Leer en el lector de placa UV-Vis a 412 nm, en caso de no contar con el lector de placa, utilizar el espectrofotómetro UV-Vis del laboratorio de Neuroquímica, con la celda de cuarzo de 40 µL.
- Criterio de aceptación:** al menos 3 curvas deben tener un coeficiente de correlación de 0.99 y un %CV ≤ 15% para cada punto, a excepción del LIC, que no debe superar el 20%.
- Para los hexaplicados, la desviación absoluta no debe superar el 15% del valor nominal.
- Los datos obtenidos se procesarán con la **Ecuación**.

Procesado de las muestras de LS:

- Para cada corrida se debe realizar al menos dos curvas de calibración con sus respectivos puntos de control.
- Se realiza un duplicado de cada muestra, tanto para los que tienen metanol como las de DTNB. La muestra es diluida en un factor de 1:20 (muestra:SA Tris-EDTA).
- Tomar 290 µL de la dilución y depositarlo en los pocillos de la placa. Posteriormente, agregar 10 µL de metanol o de DTNB, según sea el blanco de la muestra o no.

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/FEB/2024

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/FEB/2024



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**VALORACIÓN DE TIOLES
(L-CISTEÍNA) POR
ESPECTROSCOPIA UV-VIS.**

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 6 DE 7
-------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

- Dejar incubar a T.A. por 15 minutos protegida de la luz.
- Leer en el lector de placa UV-Vis a 412 nm.
- Los datos obtenidos se procesarán con la **Ecuación**.

Ecuación:

$$(A_2 - A_1 - B) \times (1.07/0.05)/13.6 = (A_2 - A_1 - B) \times 1.57 \text{ mM}$$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. Methods Enzymol. 1994;233:380-5. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33044-1. PMID: 8015473.

SEGOB. (20 de 09 de 2013). Diario Oficial de la Federación. (S. d. Salud, Editor)

Recuperado el 01 de 02 de 2024, de

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0

HISTÓRICOS DE CAMBIOS

No.	Fecha	Descripción del cambio	Justificación del cambio	Realizado por	Aprobado por
1	FEB/2024	Nueva emisión		Salvador. G	
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/FEB/2024

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/FEB/2024



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

VALORACIÓN DE TIOLES
(L-CISTEÍNA) POR
ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-SH-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 7 DE 7
-------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

FIRMA DE CONOCIMIENTO

No.	Área	Nombre	Firma	Fecha
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Elaboró: QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco. Fecha: -/FEB/2024	Revisó: Dr. Luis Antonio Tristán López Fecha: -/FEB/2024
--	--

ANEXO 2

	INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ	VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.
---	---	---

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-P-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 1 DE 6
------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

CONTENIDO:

1. Objetivo
2. Alcance
3. Responsabilidades
4. Desarrollo del proceso
 - a. Abreviaciones.
 - b. Reactivos
 - c. Procedimiento
5. Referencia bibliográfica
6. Históricos de cambio

OBJETIVO:

Establecer el procedimiento y las instrucciones que debe seguir el personal para la validación de proteínas por espectroscopía UV-Vis.

ALCANCE:

El presente PNO aplica para todo personal capacitado y con conocimiento comprobable en el manejo y uso del espectrofotómetro UV-Vis

RESPONSABILIDADES:

El responsable del área debe:

- Revisar, autorizar y firmar el PNO y sus futuras modificaciones.
- Asignar la elaboración del PNO al personal correspondiente.
- Supervisar que el PNO sea elaborado y escrito por el personal asignado
- Dar a conocer el PNO al personal encargado en uso y manejo de las muestras y el espectrofotómetro.
- Supervisar el cumplimiento del PNO.

DESARROLLO DEL PROCESO:

- a) ABREVIACIONES:
 - BCA: ácido bicinconínico.
 - BSA: albúmina sérica bovina.
 - CuSO4: sulfato de cobre pentahidratado.
 - LIC: límite inferior de cuantificación.

Elaboró: QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco. Fecha: -/SEP/2023	Revisó: Dr. Luis Antonio Tristán López Fecha: -/SEP/2023
--	--

	INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ	VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.
---	--	---

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-P-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 2 DE 6
------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

- mg: miligramo.
- mL: mililitro.
- Sol'n: solución.
- T.A.: temperatura ambiente.
- µg: microgramo.
- µL: microlitro.

b) REACTIVOS

Materiales	Reactivos	Soluciones
<ul style="list-style-type: none"> • Espectrofotómetro UV-Vis. • Lector de placa UV-Vis. • Micropipeta 2-20 µL. • Micropipeta 10-100 µL. • Micropipeta 1000-5000 µL. • Puntillas de micropipeta. • Repipeteador. • Balanza analítica • Matraz volumétrico de 5 mL • Placa de poliestireno transparente de 96 pocillos. 	Agua desionizada. BCA (#21.3 de ORGÁNICOS) 19.3 mL BSA (#14 de DESECADOR a 4°C). 10 mg CuSO4 (#21 de INORGÁNICOS).	Sol'n de CuSO4. 0.386 mL

c) PROCEDIMIENTO

Solución de CuSO4 al 4%

En caso de no contar con la solución preparada, se procederá a pesar 400 mg de CuSO4 (#21 de INORGÁNICOS) y se disolverán en 10 mL de agua desionizada.

Solución de alcalina de ácido bicinconínico y CuSO4 al 4%

Elaboró: QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco. Fecha: -/SEP/2023	Revisó: Dr. Luis Antonio Tristán López Fecha: -/SEP/2023
--	--



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-P-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 3 DE 6
------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

Se tomarán 50 volúmenes de la solución alcalina de BCA y se mezclarán con un volumen de la solución de CuSO_4 4%. Ej. 10 mL de BCA con 0.2 mL de CuSO_4 al 4%.

Solución Stock de albúmina sérica bovina:

La solución Stock de albúmina sérica bovina (#14 desecador a 4°C) deberá contener una concentración de 0.5 mg/mL (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en agua desionizada. Ej. 2.5 mg aforados en matraz volumétrico de 5 mL.

Cada día se preparará una solución fresca de BSA para los puntos de la curva de calibración y para los puntos de control.

Preparación de la curva de albúmina sérica bovina:

Posición	Vol. de sol'n Stock de albúmina (μL)	Vol. de agua (μL)	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Proteína (μg)
1	0	150	0	0
2	15	135	0.05	5
3*	22.5	127.5	0.075	7.5
4	30	120	0.1	10
5	45	105	0.15	15
7*	52.5	97.5	0.175	17.5
8	60	90	0.2	20
9	75	75	0.25	25
10*	82.5	67.5	0.275	27.5
11	90	60	0.3	30

(*) Puntos de control bajo, medio y alto.

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/SEP/2023

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/SEP/2023



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-P-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 4 DE 6
------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

Día 0: SOLUCIÓN A

Se procederá a la realización de un hexaplicado de las concentraciones de los puntos de control para su inmediata congelación.

Se procederá a preparar un decaaplicado de la concentración más baja de la curva para la obtención del LIC.

Día 1: SOLUCIÓN B

Se harán un cuadruplicado de los siete niveles de la curva de calibración, al igual que un hexaplicado de los puntos de control.

Por otro lado, se descongelará la **SOLUCIÓN A** y se procederá a la lectura por hexaplicado de las concentraciones de los puntos de control (una vez hecho, se volverá a congelar la solución).

Día 2: SOLUCIÓN C

Se harán un cuadruplicado de los siete niveles de la curva de calibración, al igual que un hexaplicado de los puntos de control.

Como se realizó el "Día 1", se volverá a descongelar la **SOLUCIÓN A** y se procederá a leer los hexaplicados de las concentraciones de los puntos de control (una vez hecho, se volverá a congelar la solución).

Día 3: SOLUCIÓN D

Se harán un cuadruplicado de los siete niveles de la curva de calibración, al igual que un hexaplicado de los puntos de control.

De la misma manera, un hexaplicado de los puntos de control (con la **SOLUCIÓN A**) serán realizados, para su lectura en el espectrofotómetro.

Día 4 (OPCIONAL): SOLUCIÓN E

Se harán un cuadruplicado de los siete niveles de la curva de calibración, al igual que un hexaplicado de los puntos de control.

De la misma manera, un hexaplicado de los puntos de control (con la **SOLUCIÓN A**) serán realizados, para su lectura en el espectrofotómetro.

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/SEP/2023

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/SEP/2023



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-P-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 5 DE 6
------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

Procesado de las muestras:

- Colocar en una placa de poliestireno de 96 pozos, 100 μ L de cada punto de la curva de calibración de manera ascendente.
- Una vez realizado, añadir 100 μ L de la solución BCA/CuSO₄
- Agitar por 30 segundos y dejar incubar a T.A. por 40 minutos protegida de la luz.
- Leer en el lector de placa UV-Vis a 562 nm, en caso de no contar con el lector de placa, utilizar el espectrofotómetro UV-Vis del laboratorio de Neuroquímica, con la celda de cuarzo de 40 μ L.

REFERENCIAS

SEGOB. (20 de 09 de 2013). Diario Oficial de la Federación. (S. d. Salud, Editor) Recuperado el 01 de 09 de 2023, de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0

HISTÓRICOS DE CAMBIOS

No.	Fecha	Descripción del cambio	Justificación del cambio	Realizado por	Aprobado por
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/SEP/2023

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/SEP/2023



INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR
ESPECTROSCOPIA UV-VIS.**

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

CÓDIGO: PNO-INNN-LNQ-P-001-CDMX	EDICIÓN: 001	SUSTITUYE A: N/A	FECHA DE EMISIÓN: -/FEB/24	PRÓXIMA REVISIÓN: -/FEB/26	PÁGINA: 6 DE 6
------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

FIRMA DE CONOCIMIENTO

No.	Área	Nombre	Firma	Fecha
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Elaboró:
QFB. Salvador Guillermo Galindo Orozco.
Fecha: -/SEP/2023

Revisó:
Dr. Luis Antonio Tristán López
Fecha: -/SEP/2023