

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Evaluación *in vivo* de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. Biol. JOSÉ HORACIO REYNA VERDUGO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TIJUANA, B.C.

SEPTIEMBRE 2020

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 297

Tijuana, B. C., a 21 de Agosto del 2020

C. José Horacio Reyna Verdugo
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los C.C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Dra. Ana Laura Martínez Martínez

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema Evaluación *in vivo* de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- TEORÍA GENERAL
- III.- DESARROLLO EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V.- CONCLUSIONES


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis

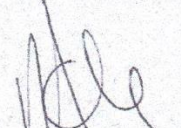

Dr. José Luis González Vázquez
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO


Dra. Ana Laura Martínez Martínez
Co- Directora de Tesis


Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Directora

AGRADECIMIENTOS

Por medio del presente me permito agradecer principalmente a mis formadores, los cuáles son personas de gran sabiduría quienes se han esforzados por ayudarme para llegar al punto en el cual me encuentro.

Sencillo no ha sido el proceso pero gracias a las ganas de transmitir sus conocimientos he logrado importantes objetivos, como terminar mi proyecto de investigación de tesis de maestría.

Agradezco enormemente al Dr. José Manuel Cornejo Bravo por su confianza brindada por permitir trabajar en el laboratorio de biofarmacia, así como a la Dra. Kenia Palomino Vizcaíno y al Dr. Héctor Magaña Badilla quienes con su amplia experiencia en la síntesis de nanogeles me fue posible obtener los materiales deseados.

Así mismo me es muy grato manifestar un amplio reconocimiento a las Doctoras, Ana Laura Martínez y Aracely Serrano quien con su valioso tiempo fueron pieza fundamental en el desarrollo del presente trabajo, apoyándome de manera directa en la manipulación y trabajo con animales así como haciendo uso de sus espacios y equipos de laboratorio asignados, sin duda ¡Pieza fundamental en este gran logro!

También agradezco a mi fiel compañero de mil batallas el MSP José Román Chávez Méndez, quien está involucrado de forma muy especial en el cumplimiento de todos los objetivos aquí planteados apoyándome siempre y guiándome con su experiencia en el área, sin duda persona clave en el desarrollo de todos los experimentos.

En especial quiero agradecer a todas las personas que me rodean desde familiares y amigos, a mis padres y hermanos quienes son pieza importantes en mis actividades diarias doy gracias infinitas a mi esposa Paola quien con su paciencia y dedicación han permitido este gran logro a mi hijo Emmanuel que siempre está presente en mí, a mi bebé Horacio que a escasos días de su nacimiento ya siento su firme apoyo. Finalmente quiero agradecer a Dios por permitir llegar a este lugar y poner los medios para encontrarme con todas las personas que de alguna manera favorecieron en el desarrollo de todo el presente trabajo.

INDICE

HOJA DE APROBACION.....	
AGRADECIMIENTOS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABLAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
CAPÍTULO I; INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Introducción.....	14
1.2 Antecedentes.....	16
1.3 Objetivo general.....	18
1.4 Objetivos especificos.....	18
1.5 Justificación.....	19
1.6 Hipótesis.....	21
CAPÍTULO II; TEORÍA GENERA.....	22
2.1 Nanotecnología.....	23
2.2 Nanogeles.....	23
2.3 Nanoportadores.....	24
2.4 Nanodiagnostico.....	24
2.5 Nanomedicina.....	24
2.6 Nanosistemas de liberación de fármacos.....	25
2.7 Modelo animal.....	25
2.8 El albinismo en ratas de laboratorio.....	27
2.9 Ratas wistar.....	27
2.10 Inflamación.....	27
2.11 Tipos de inflamación.....	28
2.11.1 Inflamación aguda.....	29
2.11.2 Inflamación crónica.....	29
2.12 Farmacología de la inflamación.....	30
2.13 Fases de la inflamación.....	30
2.13.1 Liberación de mediadores.....	30

2.13.2 Efecto de los mediadores.....	30
2.13.3 Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.....	31
2.13.4 Regulación del proceso inflamatorio.....	31
2.13.5 Reparación.....	31
2.14 Mediadores inflamatorios.....	31
2.15 Dolor.....	32
2.16 Anatomía del dolor.....	33
2.17 Clasificación del dolor.....	33
2.17.1 Dolor nociceptivo.....	33
2.17.2 Dolor somático.....	33
2.17.3 Dolor visceral.....	34
2.17.4 Dolor neuropático.....	34
2.17.5 Dolor de generación periférica.....	34
2.17.6 Dolor de generación central.....	34
2.18 Carragenina.....	34
2.19 Edema inducido.....	35
2.20 Mecanismo de acción del ácido salicílico.....	36
2.20.1 Efecto analgésico.....	36
2.20.2 Efecto antipirético.....	36
2.21 Ciclooxigenasa.....	36
2.21.1 Ciclooxigenasa -1 (COX-1)	37
2.21.2 Ciclooxigenasa -2 (COX-2)	37
2.22 Ácido salicílico.....	37
<i>CAPITULO III; DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</i>	<i>39</i>
3.1 Reactivos y materiales.....	40
3.2 Equipos.....	41
3.3 Gases.....	41
3.4 Síntesis del monómero metacrilato de o - benzoico.....	41
3.5 Síntesis de nanogeles PEGMA:MAOB.....	42
3.6 Purificación de nanogeles.....	43
3.7 Liofilización de nanogeles.....	43
3.8 Caracterización de nanogeles PEGMA:MAOB.....	43
3.9 Determinación del contenido ácido.....	44
3.10 Evaluación farmacológica.....	44

3.11	Diseño experimental.....	44
3.12	Aplicación de tratamientos y controles.....	45
3.13	Prueba de dolor inducido con formalina 1%.....	46
3.14	Prueba de inflamación inducido con carragenina 1%.....	47
3.15	Toma de muestras biológicas.....	49
3.16	Procesamiento de muestras biológicas.....	50
3.16.1	Centrifugación.....	50
3.16.2	Obtención de la muestra.....	50
3.16.3	Fijación.....	51
3.16.4	Deshidratación de la muestra.....	51
3.16.5	Inclusión en parafina	52
3.16.6	Corte en micrótopo	52
3.16.7	Tinción eosina - hematoxilina.....	52
CAPITULO IV; RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		54
4.1	Síntesis del monómero metacriloiloxi - o - benzoico	55
4.2	Síntesis de nanogeles PEGMAM:MAOB 80/20.....	55
4.3	Caracterización del monómero metacriloiloxi - o - benzoico MAOB.....	56
4.4	Bandas electroscópicas de infrarrojo para el monómero MAOB.....	57
4.5	Caracterización de nanogeles PEGMA/MAOB.....	57
4.6	Purificación de nanogeles PEGMA/MAOB.....	57
4.7	Liofilización de nanogeles PEGMA/MAOB.....	58
4.8	Prueba de dolor inducido con formalina 1% 24 horas.....	59
4.8.1	Grupo solución salina.....	59
4.8.2	Grupo ácido salicílico.....	60
4.8.3	Grupo nanogeles PEGMA-MAOB 80/20.....	61
4.9	Promedios prueba de dolor inducido con formalina 1% 24 horas.....	62
4.10	Distribucion porcentual prueba de dolor inducido con formalina 1% 24 horas.....	63
4.11	Prueba de dolor inducido con formalina 1% 24 horas	64
4.11.1	Grupo solución salina.....	64
4.11.2	Grupo ácido salicílico.....	65
4.11.3	Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 80/20.....	66
4.12	Promedios prueba de dolor inducido con formalina 1% 24 horas.....	67
4.13	Distribución porcentual prueba de dolor inducido con formalina 1%.....	68

4.14	Edema inducido con carragenina 1%.....	69
4.14.1	Grupo solución salina fisiológica 0.9%.....	69
4.14.2	Grupo ácido salicílico 1 mg/ml.....	70
4.14.3	Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 80/20 1 mg/kg.....	71
4.15	Promedios del porcentaje inflamatorio por tiempos.....	72
4.16	Distribución porcentual del volumen inflamatorio.....	73
4.17	Edema inducido con carragenina 1% en concentración 0.50% – 0.30%.....	74
4.17.1	Grupo Solución Salina.....	74
4.17.2	Grupo Ácido Salicílico.....	75
4.17.3	Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 50%.....	76
4.17.4	Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 30%.....	77
4.18	Porcentaje inflamatorio del edema inducido con carragenina 1%.....	78
4.19	Distribución porcentual del volumen inflamatorio.....	79
4.20	Evaluación histopatológica.....	80
CAPITULO IV; CONCLUSIONES.....		81
5.1	Conclusión.....	82

INDICE DE IMAGENES

Ilustración 1. Modelo animal de ratas wistar.....	27
Ilustración 2. Modelo inflamatorio de ratas wistar.....	28
Ilustración 3. Síntesis de Nanogeles PEGMA/MAOB.....	43
Ilustración 4. Aplicación de tratamientos experimentales.....	46
Ilustración 5. Prueba de dolor inducido con formalina 1%.....	47
Ilustración 6. Prueba de dolor inducido con carragenina 1%.....	48
Ilustración 7. Toma de muestra sanguine por punción cardiaca y toma de muestra histológica.....	50
Ilustración 8. Esquema general del procesamiento histológico.....	53
Ilustración 9. Monómero MAOB.....	55
Ilustración 10. Entrecruzamiento de Nanogeles PEGMA/MAOB.....	55
Ilustración 11. FTIR del MAOB.....	56
Ilustración 12. Evaluación histopatológica.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos funcionales del MAOB.....	57
Tabla 2. Caracterización del MAOB.....	57
Tabla 3. Purificación de Nanogeles PEGMA/MAOB.....	58
Tabla 4. Liofilización de Nanogeles PEGMA/MAOB.....	58
Tabla 5. Prueba de dolor grupo solución salina.....	83
Tabla 6. Prueba de dolor grupo ácido salicílico.....	83
Tabla 7. Prueba de dolor grupo Nanogeles PEGMA/MAOB.....	84
Tabla 8. Prueba de dolor grupo solución salina 48 horas.....	84
Tabla 9. Prueba de dolor grupo ácido salicílico 48 horas.....	85
Tabla 10. Prueba de dolor grupo Nanogeles PEGMA/MAOB.....	85
Tabla 11. Prueba de inflamación grupo solución salina.....	86
Tabla 12. Porcentaje inflamatorio grupo solución salina.....	86
Tabla 13. Prueba de inflamación grupo ácido salicílico.....	87
Tabla 14. Porcentaje inflamatorio grupo ácido salicílico.....	87
Tabla 15. Prueba de inflamación grupo Nanogeles PEGMA/MAOB.....	88
Tabla 16. Porcentaje inflamatorio grupo nanogeles PEGMA/MAOB.....	88
Tabla 17. Prueba de inflamación grupo solución salina.....	89
Tabla 18. Porcentaje inflamatorio grupo solución salina.....	99
Tabla 19. Prueba de inflamación grupo ácido salicílico.....	90
Tabla 20. Porcentaje inflamatorio grupo ácido salicílico.....	90
Tabla 21. Prueba de inflamación grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 50%.....	91
Tabla 22. Porcentaje inflamatorio grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 50%.....	91
Tabla 23. Prueba de inflamación grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 30%.....	92
Tabla 24. Porcentaje inflamatorio grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 30%.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

AG Anhidro galactosa

AG Aparato de Golgi

AINES Antiinflamatorios no esteroideos

APS Persulfato de amonio

AS Ácido Salicílico

COX Ciclooxygenasa

COX-1 Ciclooxygenasa 1

COX-2 Ciclooxygenasa 2

Dh Diámetro hidrodinámico

DMAP dimetilaminopiridina

DVA 3,9-Divinil-2, 4, 8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

EGDMA Etilenglicol dimetacrilato

ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

HCl Ácido Clorhídrico

HETE hidroxieicosatetraenoico

HT hidroxitriptamina

IL-1 Interleucinas

MAOB Ácido Metacrililoiloxi-o-benzoico

MgSO₄ Sulfato de Magnesio anhidro

mL Mililitros

Mmol Milimolar

MWCO Molecular weight cut off (peso molecular límite)

NaCl Cloruro de sodio

NaOH Hidróxido de sodio

NGF (nerve growth factor) Factor de crecimiento de nervios

Nm Nanómetro

NOM Norma oficial mexicana

ON Óxido nítrico

PEG Polietilenglicol

PEGMA 1100 Poli (etilenglicol) metil éter metacrilato (1100 g/mol)

PEGMA Poli (etilenglicol) metil éter metacrilato

PGE2 prostaglandina E2

PGEs Prostaglandinas

pH Potencial de hidrógeno

PVC Cloruro de polivinilo

REDOX oxidación-reducción

SCF (Stem cell factor) factor de células madre

SS Solución Salina

TNF- α Factor de necrosis tumoral

TX Tromboxanos

UV Visible ultravioleta-visible

RESUMEN

Evaluación *in vivo* de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico

Presentado por

LIC. BIOL. JOSÉ HORACIO REYNA VERDUGO

Director de tesis

Dr. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

Co-Director de tesis

DRA. ANA LAURA MARTINEZ MARTINEZ

El presente estudio de investigación realizado en la Facultad de Ciencias Químicas, la Facultad de Medicina Otoy y la Facultad de Ciencias de la Salud Valle de la Palmas de la Universidad Autónoma de Baja California en los laboratorios de biofarmacia, neurociencias y epidemiología molecular respectivamente donde se desarrolló la síntesis del ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB), el cual se sintetizó mediante un método previamente reportado, para la síntesis de nanogeles PEGMA-MAOB se utilizó un método de polimerización en emulsión sin detergente en concentración 80/20 respectivamente, utilizando EDGMA como entrecruzante y logrando así nanogeles de un diámetro hidrodinámico de entre 180-240 nm se realizó la caracterización de dichas nanopartículas utilizando un Zetasizer Nano NS, el ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB), y el contenido del MAOB incorporado en las nano partículas de MAOB se determinó mediante titulaciones ácido-base.

Asimismo se realizó un análisis y una evaluación del efecto de los nanogeles de metacrilato de ácido salicílico en modelos marinos, haciendo comparación de su efecto con un control de solución salina y con ácido salicílico, induciendo dolor y edema en ratas wistar mediante carragenina y formalina para evaluar el efecto antiinflamatorio se empleó el método de edema plantar inducido por λ cartagenina, utilizándose ratas albinas wistar divididas en grupos control y tratamientos (1mg/kg) para el efecto antiinflamatorio inducido por edema con carragenina se utilizó un pletismómetro digital PANLAB LE 7500, midiendo el aumento de volumen en la pata inducida y logrando establecer una relación entre la extremidad basal y la extremidad inducida, el mayor efecto antiinflamatorio se evidenció al tiempo de 4 horas posteriores al tratamiento el efecto antiedematogénico se evaluó contabilizando el número de contracciones musculares de la extremidad tratada durante el primer minuto de un lapso de cinco minutos durante una hora. Se tomaron muestras biológicas de los tratamientos y controles por punción cardiaca para análisis de concentración de interleucinas y citoquinas proinflamatorias por la técnica molecular de ELISA de igual forma se realizó toma de muestra de tejido de los animales en el sitio de la extremidad puncionada para histopatología, produciendo cortes de 3 μ m y desarrollando tinción de eosina – hematoxilina.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

La inflamación y el dolor son procesos fisiológicos comunes que deterioran la salud de las personas; están relacionadas a una gran cantidad de enfermedades que afectan a la población en general y que son evidenciados en nuestra vida cotidiana al acudir a cualquier establecimiento de salud o bien al manifestarse de manera directa en los pacientes afectados. (Kuprash and Nedospasov, 2016). Es por eso, que el propósito de la presente investigación es aportar mediante el trabajo con la manipulación de ratas wistar *Rattus norvegicus* las propiedades analgésicas y antiinflamatorias descritas por diferentes grupos de ratas en condiciones normales, realizando aplicaciones de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico para poder utilizar dichos nanogeles como alternativa frente a los fármacos convencionales, para el tratamiento de las dolencias ya mencionadas.

Ahora entendemos que la inflamación está estrechamente ligada a la inmunidad innata y sus mecanismos moleculares, y muchos mediadores inflamatorios son una parte de la inmunidad innata inherente a todos los organismos multicelulares. (Kuprash and Nedospasov, 2016)

De igual manera se sabe que la mayoría de fármacos utilizados para el tratamiento de la inflamación y el dolor han demostrado diferentes efectos adversos principalmente a nivel digestivo y sistema nervioso central es por eso que se busca una nueva alternativa en el mecanismo de liberación de fármacos.

Por tal motivo, es muy importante investigar y sugerir terapias alternativas, útiles para mitigar estos padecimientos mediante el uso de nuevas técnicas de liberación de fármacos, ya que cuentan con un gran potencial farmacológico y económico.

Desde hace unos años la nanotecnología se está perfilando como un área emergente en la nanomedicina, la aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud, la nanotecnología es la rama que se perfila como la de mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. La detección temprana de enfermedades, su tratamiento precoz personalizado y un preciso seguimiento posterior de su evolución serán posibles en los próximos años gracias a la

aplicación de las herramientas nanotecnológicas que se están desarrollando actualmente. Los importantes avances en este campo podrían dar lugar a sistemas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos de mayor eficacia que los existentes, lo que redundaría en una mayor calidad de vida para el hombre. Una auténtica revolución se vislumbra en el horizonte del cuidado de la salud y la tecnología médica (Lechuga Laura, 2005)

Desde la década de 1960 hasta la actualidad, una gran variedad de nanomateriales y dispositivos orgánicos e inorgánicos se han utilizado como vehículos acarreadores de fármacos para desarrollar alternativas terapéuticas efectivas. Hasta ahora, hay más de dos docenas de productos terapéuticos basados en la nanotecnología aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico, y hay más en ensayos clínicos. (Lechuga Laura, 2005)

1.2 ANTECEDENTES

En 2003 Licea-Claveríe, Rogel-Hernández, y López-Sánchez lograron la síntesis del monómero (MAOB) ácido metacriloil-o-benzoico un derivado del ácido salicílico, el cual es un monómero anfifílico, producido a partir de una técnica sintética previamente desarrollada (Cornejo-bravo *et al.*, 2005). A partir de este monómero, se ha logrado el desarrollo de hidrogeles estabilizados con PEGMA (Serrano-Medina, Cornejo-Bravo and Licea-Claveríe, 2012); Y en estudios realizados se ha demostrado que los materiales formados se hidrolizan en soluciones que simulan las condiciones fisiológicas para generar ácido salicílico. (Rodríguez-Vázquez *et al.* 2018).

(Rodriguez-Vazquez *et al.* 2018) Lograron incorporar el ácido metacriloiloxi-o-benzoico (MAOB) al nanogel, mediante la técnica de polimerización en emulsión sin detergente con diferentes proporciones de entrecruzantes EGDMA o DVA fue posible lograr nanogeles menores a 200 nanómetros utilizando los dos entrecruzantes. Los estudios de liberación demostraron que en un medio de pH 6.0 y pH 7.4, simulando las condiciones fisiológicas, el profármaco polimérico es hidrolizable en su grupo éster, para formar ácido salicílico, el cual pudo ser cuantificado mediante rectas de calibración de ácido salicílico, utilizando espectrofotometría de UV visible.

(Marinho *et al.*, 2018) Han desarrollado un trabajo para investigar los efectos antinociceptivos y antioedematogénicos y el perfil de toxicidad de un nuevo candidato AINE, llamado salicytamida. En ese trabajo se presenta, que la salicytamida es capaz de provocar efectos antinociceptivos periféricos y centrales más potentes, así como la capacidad antioedematogénica *in vivo*.

(Marinho *et al.*, 2018) Evaluó diversos fármacos AINES entre estos el ácido salicílico y la carragenina como agente edematogénico y formalina como agente nociceptivo inflamatorio.

En las últimas décadas diferentes sistemas de liberación de fármacos han salido al mercado farmacéutico, en 2015 Ouimet *et al.*, desarrollando mezclas de diferentes polímeros lograron incorporar ácido salicílico para reducir la inflamación.

Los hidrogeles son particularmente adecuados como materiales de apósito para heridas debido a su suavidad intrínseca, flexibilidad, adhesión a una piel sana sin afectar el lecho de la herida, y la capacidad de prevenir exposición al final del nervio, lo que disminuye el dolor. (Ouimet *et al.*, 2015) Han desarrollado un hidrogel para combatir los problemas asociados con la inflamación, Los investigadores han logrado las terapias de hidrogel combinadas que utilizan elementos bioactivos. Uno de esos ejemplos incluye una terapia tópica en la que el ácido salicílico (SA), un medicamento antiinflamatorio no esteroideo, que se mezcló con un apósito de hidrogel y demostrado ser eficiente en la reducción cicatrices hipertróficas.

En el año 2000 (Erdmann, Macedo and Urich, 2000) investigaron implantes degradables de poliéster de anhídrido) en los que el esqueleto del polímero se descompone en ácido salicílico (SA). Logrando así una reestructuración ósea y una liberación del ácido salicílico de los polianhídridos degradables, después de 20 días, los sitios de polímeros activos mostraron un mayor grosor de hueso palatino nuevo y sin áreas de resorción, mientras que los sitios de polímeros de control mostraron menos grosor de hueso y resorción, incluidas algunas que involucran cemento y dentina. A partir de estos estudios preliminares, se concluye que los poliésteres de anhídrido estimulan la reestructuración y formación ósea.

La inflamación es un conjunto completo de respuestas fisiológicas a un organismo extraño, que incluye patógenos humanos, partículas de polvo, virus, bacterias entre otros, incluso ciertas enfermedades crónicas se manifiestan con síntomas inflamatorios, Investigaciones recientes han aclarado que la inflamación es un factor importante para la progresión de diversas enfermedades como trastornos crónicos, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos oculares, artritis, obesidad, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias intestinales. (Arulselvan *et al.*, 2016). En 2020 (Yang *et al.*, 2020) diseñaron nanogeles transdérmicos enriquecidos con aceite de magnesio de metotrexato para mejorar la movilidad de las articulaciones artríticas, reparar y reducir la inflamación y el dolor.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los nanogeles de metacrilato de ácido salicílico, en modelos murinos post inducción de carragenina y formalina para evaluación del efecto antiinflamatorio y analgésico.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Inducir edema en ratones utilizando carragenina como agente edematogénico.
- 2) Estudiar el efecto antiinflamatorio de los nanogeles de ácido salicílico.
- 3) Estudiar el efecto de la formalina como agente nociceptivo en presencia de nanogeles de ácido salicílico.
- 4) Estudiar el efecto de la carragenina como agente inflamatorio en presencia de nanogeles de ácido salicílico.
- 5) Determinar la concentración mínima antiinflamatoria.

1.5 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se enfocará en estudiar los efectos de la inflamación y el dolor *in vivo* frente a los nanogeles de metacrilato de ácido salicílico ya que debido a los principales efectos en los sistemas de liberación y entrega de fármacos estos dos mecanismos fisiológicos terminan causando serios problemas en la salud de las personas a nivel mundial. Así, el presente trabajo permitirá mostrar la respuesta de la inflamación y el dolor en ratas wistar, además de permitir realizar una comparación integral en controles usados de solución salina fisiológica y ácido salicílico. Por tal motivo, en esta investigación se pretende desarrollar nanopartículas menores a 200 nm, a base de poli(etilenglicol) metil éter metacrilato, cargadas con un derivado del ácido salicílico, con la capacidad de hidrolizarse y liberar ácido salicílico en soluciones fisiológicas, a fin de conseguir maximizar los efectos terapéuticos, disminuyendo los efectos secundarios.

Los motivos que llevaron a la realización del presente trabajo de investigación fueron basados principalmente en que la gran mayoría de fármacos (AINES) no tienen la capacidad de llegar hasta la zona afectada, por diversas razones no terminan teniendo un efecto significativo en la zona de lesión, es por eso que se desarrolla el estudio de la hidrólisis del ácido metacriloiloxi-o-benzoico cargado en un nanogel para facilitar su biodisponibilidad, liberando por hidrólisis ácido salicílico y su fácil acceso por las células afectadas.

Los sistemas de liberación se han desarrollado para modificar la vía de administración en beneficio del paciente, mejorar la biodisponibilidad, cambiar el perfil de liberación o mejorar una formulación para una nueva presentación y línea de venta. En contraste, la nanomedicina propone que los sistemas de liberación se deben desarrollar para identificar el sitio blanco, el cual puede ser un órgano, una célula, un compartimento celular, núcleo, citoplasma o incluso, otro orgánulo. (Rojas-aguirre, 2016)

Muchos fármacos actúan sobre dianas intracelulares dentro de orgánulos específicos. Por ejemplo, medicamentos contra el cáncer interfieren con la replicación del ADN y la traducción en el núcleo, la síntesis de proteínas y plegado

en el retículo endoplasmático, la glicosilación de proteínas en el aparato de Golgi (AG), la actividad metabólica en la mitocondria, y así sucesivamente. (Maity and Stepensky, 2015) La capacidad de un fármaco de dirigirse a un sitio específico de la célula y entregar selectivamente su carga terapéutica es muy importante. Además, que la entrega del fármaco deberá ser de manera controlada en respuesta a un estímulo interno (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externo (luz, temperatura, campo magnético) para poder liberar la carga terapéutica. (Mura, Nicolas and Couvreur, 2013)

1.6 HIPÓTESIS NULA

La aplicación de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico en modelos murinos no tiene un efecto significativo en comparación con los sistemas de liberación de fármacos convencionales.

1.7 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

La aplicación de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico en modelos murinos tiene un efecto significativo en comparación con los sistemas de liberación de fármacos convencionales.

CAPÍTULO II
TEORÍA GENERAL

2.1 NANOTECNOLOGIA

La nanotecnología es la creación y utilización de materiales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia en la escala nanométrica (mil millonésima parte de un metro). Diversas nanotecnologías y sus aplicaciones en las ciencias de la vida se describen en detalle en otra parte, bajo el término bionanotecnología (Jain, 2005). El término nanotecnología hace referencia a una serie de disciplinas que estudian y manipulan la materia a nivel de las nanoescalas. Una de las áreas más importantes de la nanotecnología es la nanomedicina, la cual está enfocada en gran medida en el diseño de nanosistemas de liberación de fármacos que prometen revolucionar las terapias convencionales, especialmente aquellas dirigidas al tratamiento del cáncer. (Rojas-aguirre, 2016)

2.2 NANOGELES

Los nanogeles son sistemas de liberación de fármacos que pueden pasar la barrera hematoencefálica y liberar fármacos al sitio deseado. Han sido utilizados como sistemas de liberación de fármacos para el manejo de enfermedades cerebrales como Alzheimer, migraña, esquizofrenia y depresión. (Aderibigbe and Naki, 2018). Los nanogeles también se han desarrollado como portadores de vacunas para protección de infecciones bacterianas como influenza, meningitis, neumonía y como portadores de vacunas para la protección de animales contra la encefalomielitis y la enfermedad de boca y pie. Se han desarrollado como portadores de vacunas para la prevención de enfermedades en pacientes con obesidad. Los nanogeles han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades cerebrales. En la aplicación de nanogeles como vacuna los portadores también indujeron respuestas significativas asociadas con la inmunidad protectora contra seleccionados Infecciones bacterianas y virales. (Aderibigbe and Naki, 2018)

2.3 NANOPORTADORES

La llegada de los nanoportadores para la entrega de fármacos ha dado lugar a nuevos escenarios en la medicina moderna. De hecho, los nanoportadores superan en parte los límites de los citotóxicos tradicionales. Las características de estos sistemas minimizan en gran medida las reacciones adversas y garantizan una liberación más precisa del compuesto al sitio afectado. Varios nanoportadores han sido desarrollados para la administración de fármacos citotóxicos como el paclitaxel y la doxorubicina para mejorar tanto el resultado como la calidad de vida de los pacientes. (Chen *et al.*, 2015)

2.4 NANODIAGNOSTICO

El nanodiagnóstico se define como el uso de la nanotecnología con fines de diagnóstico clínico (Jain, 2005). Los nanomateriales permiten un diagnóstico más sensible y específico de patologías y actualmente se están utilizando como agentes de contraste para la obtención de imágenes moleculares y de células enteras *in vitro* e *in vivo*.

2.5 NANOMEDICINA

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud, es la rama de la nanotecnología que se perfila como la de mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. La detección temprana de enfermedades, su tratamiento precoz personalizado y un preciso seguimiento posterior de su evolución serán posibles en los próximos años gracias a la aplicación de las herramientas nanotecnológicas que se están desarrollando actualmente. (Lechuga, 2005). La nanomedicina y su investigación han estado formando varios campos emergentes en los últimos años. Se estima que es una industria de \$160 mil millones para mercados basados en nanomedicina. Existen amplias aplicaciones de la nanotecnología en la nanomedicina, que incluyen la administración de fármacos, reactivos de contraste, nanoanalíticos, bionanomateriales, nanofarmacéuticos y nanorobóticos médicos. Los sistemas de administración de fármacos desarrollados a partir de la nanotecnología se utilizan

ampliamente para el diagnóstico, el tratamiento, la y vigilancia relacionada con las enfermedades. (Zhao, 2018)

2.6 NANOSISTEMAS DE LIBERACION DE FARMACOS

Los sistemas de liberación de fármacos en nanopartículas son ampliamente utilizados en la investigación farmacéutica y en entornos clínicos para mejorar la efectividad de agentes de diagnóstico, incluidos fármacos anticancerígenos, fármacos antimicrobianos y antivirales (Torchilin, 2014). Los tipos de nanoportadores que existen son diversos e incluyen los siguientes: liposomas; nanopartículas poliméricas; micelas poliméricas; sílice, oro, plata y otras nanopartículas metálicas; nanotubos de carbono; nanopartículas lipídicas sólidas, niosomas y dendrímeros. El uso de los nanosistemas de liberación de fármacos puede superar varios problemas que están asociados con las técnicas farmacológicas convencionales, como una baja solubilidad acuosa, baja biodisponibilidad y una distribución no específica en el cuerpo. (Prosperi *et al.*, 2017)

2.7 MODELO ANIMAL

En la actualidad las ciencias biomédicas obtienen su información más relevante de distintos arreglos experimentales, los estudios *in vitro*, los cuales emplean sustancias, tejidos y células, sin embargo los estudios *in vivo* emplean animales, es importante que el animal creado y criado en y para el laboratorio puede ser distinto en su contraparte vida silvestre es por esto que el cuidado, la utilización apropiada y el trato humanitario de los animales empleados en investigación, las pruebas de laboratorio requieren de un conocimiento especializado en los ambientes, procesos y procedimientos relacionados con su uso y su cuidado ello también implica el establecimiento de condiciones de infraestructura y ambientes de trabajo propios y específicos, en la actualidad en los laboratorios donde se realiza experimentación animal se exige que dichas condiciones sean certificadas y categorizadas según sus competencias y necesidades. Por eso es importante un programa de aseguramiento de la calidad que incluya control sanitario y genético y entrenamiento y validación permanente

de procesos y procedimientos de laboratorio como el conocimiento de la etología de cada especie utilizada. (Cardozo *et al.*, 2007)

La rata (*Rata norvegicus*) fue la primera especie de mamífero domesticado para la investigación científica con trabajos que se remontan a antes de 1850. Desde entonces, la rata tiene un papel principal en varios campos de investigación, como fisiología, farmacología, neurociencias, genética y ciencias médicas. Entre las cepas de ratas disponibles ahora, el albino y el piebald son los más comunes. (Kuramoto *et al.*, 2012)

Los modelos animales son herramientas indispensables en la investigación biomédica. Han sido utilizados desde los primeros días del descubrimiento científico y continúan siendo utilizados hoy en día para nuestro entendimiento de las funciones individuales de los genes, los mecanismos de diferentes enfermedades y la efectividad y toxicidad de varios fármacos y compuestos químicos. Los genomas de muchos organismos modelo han sido secuenciados, y se ha descubierto que muchos genes se encuentran conservados entre los organismos modelo y el humano. (Beura *et al.*, 2016)

2.8 EL ALBINISMO EN RATAS DE LABORATORIO

La mayoría de los roedores de laboratorio son albinos, debido a una mutación común en el gen de la tirosinasa en todas las cepas de ratas albinas de laboratorio y en por lo menos algunas de las cepas de ratones albinos. La tirosinasa es la enzima responsable de la producción del pigmento melanina. La prevalencia de albinismo entre los roedores de laboratorio es debido a que muchas de las cepas establecidas en un principio eran albinas, y además el albinismo es un marcador para una fácil selección. (Kuramoto *et al.*, 2012)

2.9 RATAS WISTAR

Actualmente las ratas wistar son una de las cepas más populares y utilizadas cotidianamente para la investigación en el laboratorio, por lo que éste mamífero sirve como un organismo modelo para el análisis de un número importante de características biomédicas y toxicológicas (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013) así como para estudiar la nutrición enteral y parenteral inclusive es considerado como importante herramienta para la investigación de las condiciones que afectan a los seres humanos y que pueden ser simuladas en ratas.

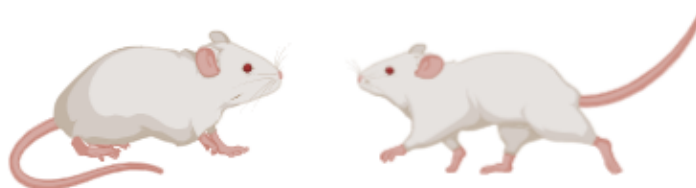


Ilustración 1. Modelo animal de ratas wistar

2.10 INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso adaptativo a los estímulos nocivos a los que el cuerpo humano está constantemente expuesto (Varela *et al.*, 2018) representa una amplia gama de respuestas fisiológicas, es un proceso fisiológico, defensivo natural del organismo ante agresiones del medio, presentando signos como el dolor, calor, rubor y edema, además de pérdida de funcionalidad generalmente ocasionado por un organismo extraño, incluidos los patógenos humanos, el polvo, partículas y virus. (Arulselvan *et al.*, 2016)

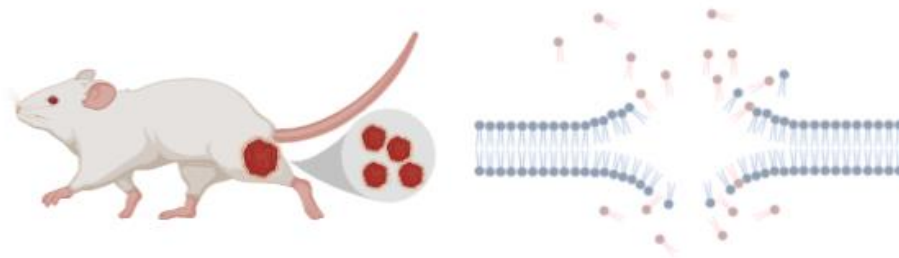


Ilustración 2. Modelo inflamatorio de ratas wistar

2.11 TIPOS DE INFLAMACION

Las inflamaciones se dividen principalmente en inflamaciones agudas y crónicas dependiendo de varios procesos inflamatorios y mecanismos celulares. Investigaciones recientes han aclarado que la inflamación es un factor importante para la progresión de diversas enfermedades o trastornos crónicos, como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos oculares, artritis, obesidad, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias intestinal. (Arulselvan *et al.*, 2016)

La inflamación implica la participación de una amplia clase de mediadores biológicos, tales como la histamina, la serotonina, bradiquinina, citoquinas y las prostaglandinas. Estos agentes inflamatorios promueven la vasodilatación y la migración de neutrófilos de la sangre hacia los tejidos inflamados. (Sousa-neto, 2018) La interacción entre los mediadores químicos desencadena una secuencia de eventos moleculares, y luego da origen al proceso inflamatorio, desarrollo del dolor, y en algunos casos la pérdida de la función. La respuesta inflamatoria se define como una reacción normal de tejido vivo a un área lesionada. (Dinarello, 2010; Marinho *et al.*, 2018) La falta de recuperación de la zona lesionada aumenta el daño por la formación de tejido de granulación y la acumulación de células secretoras liberación de enzimas y radicales libres, que aumenta positivamente la inflamación local, perjudicando así la reparación del área dañada. (Gautam and Jachak, 2009).

2.11.1 INFLAMACION AGUDA

En la fase aguda de la respuesta inflamatoria, las células del sistema inmune migran al sitio de la lesión en una secuencia de eventos cuidadosamente orquestada que es facilitada por mediadores solubles como las citoquinas, las quimosinas y las proteínas de fase aguda. (Germolec *et al.*, 2018). En este tipo de inflamación las citoquinas proinflamatorias liberadas crean un circuito proinflamatorio que puede separarse del tejido lesionado y entrar en el torrente sanguíneo, lo que lleva a la cascada o tormenta de citoquinas los receptores de órganos específicos son activados por estas citoquinas y se produce una reacción sistémica, ésta reacción es la llamada respuesta de fase aguda. (Varela *et al.*, 2018) Y es aquí donde el hígado juega un papel muy importante comienza a aumentar la producción de ciertas proteínas: proteína C reactiva, amiloide A sérico, haptoglobina, fibrinógeno, α -globulinas con actividad antiproteasa, lipopolisacárido, proteínas de unión, ceruloplasmina, factor del complemento 3 y disminución de la síntesis de otras proteínas, lo que conduce a la disminución de ciertas sustancias en el suero: zinc, hierro, albúmina, transferrina, globulina fijadora de cortisol, transtiretina y proteína de unión a retinol. La proteína C reactiva es el mejor indicador clínico de respuesta de fase aguda.

2.11.2 INFLAMACION CRONICA

La inflamación es una respuesta fisiológica normal que causa que sane el tejido lastimado. Un proceso inflamatorio empieza cuando los compuestos químicos son liberados por el tejido dañado. Como respuesta, los glóbulos blancos producen sustancias que hacen que las células se dividan y crezcan para reconstruir el tejido para ayudar a reparar la lesión. Una vez que sane la herida, terminará el proceso inflamatorio. (Piktel *et al.*, 2019)

En la inflamación crónica, el proceso inflamatorio puede empezar aun cuando no haya lesión, y no termina cuando debería terminar. No siempre se sabe por qué continúa la inflamación. La inflamación crónica puede ser causada por infecciones que no desaparecen, por reacciones inmunitarias anormales a los tejidos normales o por estados como la obesidad. Con el tiempo, la inflamación crónica puede causar daño al ADN y llevar al cáncer. Por ejemplo, la gente con

enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, tiene un riesgo mayor de cáncer de colon. (Korniluk *et al.*, 2017)

2.12 FARMACOLOGIA DE LA INFLAMACION

Los fármacos utilizados comúnmente en el tratamiento de la inflamación incluyen los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos, que son capaces de promover varios efectos secundarios, tales como úlceras gástricas, dispepsia, sangrado y trastornos cardiovasculares (Dinarello, 2010; Sousa-neto, Gomes and Cunha, 2018)

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cinco signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor, Dolor y pérdida de función. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acumulación de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor, los llamados nociceptores y finalmente una disminución o pérdida de la función del tejido en la zona afectada (Dinarello, 2010)

2.13 FASES DE LA INFLAMACIÓN

De forma esquemática podemos dividir la inflamación en cinco etapas:

3.13.1 Liberación de mediadores

Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.

3.13.2 Efecto de los mediadores

Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.

3.13.3 Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco inflamatorio, generalmente llamadas mediadores.

3.13.4 Regulación del proceso inflamatorio

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso inflamatorio.

3.13.5 Reparación

Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito. (Coussens and Werb, 2002). El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados, los mastocitos son leucocitos derivados de células hematopoyéticas pluripotenciales CD34+ de la médula ósea que, a diferencia de otras células mieloides, completan su diferenciación y maduración en los tejidos periféricos. Su crecimiento y diferenciación se producen bajo la influencia de las citoquinas, IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 y el factor de células madre (stem cell factor, SCF), factores de crecimiento, factor de crecimiento de nervios (nerve growth factor, NGF), prostaglandina E2 (PGE2) y por la interacción con determinadas moléculas de adhesión (Doctoral *et al.*, 2014). Cuando se activan, liberan estos factores, junto con otros de carácter lipídico que son sintetizados de novo. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados. (Inflamatorio, 2018)

2.14 MEDIADORES INFLAMATORIOS

Todos los procesos inflamatorios, ya sean de origen inmune u otro, llevan consigo la activación de macrófagos residentes y la infiltración de leucocitos desde la sangre. La activación induce cambios en las células entre los cuales se incluyen

la producción de citoquinas. Determinadas citoquinas originan directa o indirectamente la cascada de eventos que generan otros mediadores esenciales en la respuesta inflamatoria. (Esp *et al.*, 2014)

De las numerosas citoquinas presentes en el sitio de la inflamación, dos de ellas, IL-1 y TNF- α , juegan un papel fundamental. Algunas de sus acciones sobre diversos tipos celulares son: la producción de mediadores lipídicos, enzimas proteolíticas y radicales libres, todos estos elementos involucrados en el daño observado.

2.15 DOLOR

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (AIED), éste se define como una experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial descrita en términos de tal daño. De esta definición se desprenden varios conceptos importantes. El primero, que el dolor es una experiencia subjetiva y por tanto diferente para cada individuo; el segundo es la existencia o no de una lesión tisular real, es decir no es necesaria la presencia de una lesión morfológica que justifique el dolor de un paciente (Navas and Gonz, 2008) otros autores dicen que el dolor es la experiencia subjetiva de daño en una parte del cuerpo, (Bell, 2018) pero independientemente del motivo es uno de los signos cardinales de inflamación, es una respuesta compleja que involucra la interacción de múltiples mediadores inflamatorios liberados en sitios de inflamación de las lesiones tisulares. El papel de las prostaglandinas en el dolor después de lesión mecánica o química está bien establecida (Yang *et al.*, 2020). Las prostaglandinas han sido detectadas en exudados inflamatorios hay muchos indicios de que el principal papel de las prostaglandinas es la sensibilización de los receptores del dolor a otros mediadores. (Niv and Devor, 2004). Estos mediadores se derivan de varias fuentes. El dolor se clasifica razonablemente como un síntoma de lesión o enfermedades como el estreñimiento, las náuseas o bien algunas lesiones, estos son síntomas que en ocasiones se pueden traducir en dolor. Cuando el paciente resuelve su trastorno, también lo hace su síntomas de dolor, Sin embargo, no sucede lo mismo en el caso de dolor crónico donde las erupciones cutáneas de la infección por herpes zoster, por ejemplo, o la crudeza

de una incisión quirúrgica, puede sanar completamente pero deja a su paso un dolor persistente que dura por meses o años. Aunque desencadenado por un proceso de enfermedad agudamente doloroso, tal dolor se vuelve independiente. (Niv and Devor, 2004)

2.16 ANATOMIA DEL DOLOR

La señal es recogida por los nociceptores y enviada hacia el sistema nervioso central pasando por varias estaciones la primera señal se sitúa en los ganglios espinales dorsales, a continuación, la señal pasa por el asta dorsal de la medula espinal, asciende hacia diversas estructuras subcorticales, entre las que destaca el tálamo, hasta llegar a la corteza cerebral, con especial importancia de la corteza somatosensorial, la circunvolución cingulada anterior, la ínsula, la corteza prefrontal y parietal inferior. Es en estas estructuras, en las que se origina la percepción consciente del dolor y las actividades subconscientes y respuestas neuromoduladoras (efectoras, endocrinas, y emocionales) iniciadas consciente e inconscientemente. (Navas and Gonz, 2008)

2.17 CLASIFICACION DEL DOLOR

Aunque existen numerosos criterios de clasificación, los más utilizados se basan en el mecanismo neurofisiológico, en el aspecto temporal, en la intensidad, en la etiología y en la región afectada.

3.17.1 Dolor nociceptivo

Se origina por la estimulación de nociceptores periféricos, que traducen esta señal en impulsos electroquímicos que se transmiten al sistema nervioso central. A su vez se puede subclasificar en:

3.17.2 Dolor somático

Originado en la piel y en el aparato locomotor, se caracteriza por estar bien localizado.

3.17.3 Dolor visceral

Originado en las vísceras, se caracteriza por estar mal localizado y referido a zonas cutáneas a veces alejadas de la lesión.

3.17.4 Dolor neuropático

Se origina por una actividad neuronal anormal por lesión del sistema nervioso central o periférico. Es prolongado, severo, quemante, constante con paroxismos.

Existen tres subgrupos de dolor neuropático:

3.17.5 El dolor de generación periférica

Como las radiculopatías cervical o lumbar, las lesiones de los nervios espinales y las plexopatías braquial o lumbosacra.

3.17.6 El dolor de generación central

Que implica una lesión del sistema nervioso central (SNC) a nivel de la médula espinal o a un nivel superior.

El síndrome doloroso regional complejo (SDRC), denominado previamente distrofia simpática refleja o causalgia. Se caracteriza por alteración autonómica localizada en el área afectada, presentando el paciente cambios vasomotores, sudoración, edema y atrofia (Barón, 2000)

2.18 CARRAGENINA

La carragenina es un nombre genérico para una familia de geles y viscosificantes polisacáridos, que se obtienen por extracción de ciertas especies de algas rojas (Necas and Bartosikova, 2013)

La carragenina es un poligalactano sulfatado con 15 a 40% de contenido de éster sulfato y una masa molecular relativa media muy por encima de 100 kDa. Está formado por unidades alternas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG) unidas por α -1,3 y la vinculación β -1,4-glicosídico. La carragenina se clasifica en varios tipos, tales como λ , κ , ι , ϵ , μ todos con contenido de 22 a 35% de grupos sulfato. Esta clasificación se realiza en base a su solubilidad en cloruro de potasio.

Las diferencias principales que influyen en las propiedades de tipo de carragenina son el número y posición de los grupos éster sulfato, así como el contenido de 3,6-AG. (Posadas *et al.*, 2004)

2.19 EDEMA INDUCIDO

El edema de pata de rata inducido por carragenina es una prueba ampliamente utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria y constituye un modelo animal simple y de rutina para la evaluación de dolor en el sitio de la inflamación sin ninguna lesión o daño a la pata inflamada. El edema de la pata se ha utilizado ampliamente para probar nuevos medicamentos antiinflamatorios, así como para estudiar los mecanismos implicados en la inflamación. (Posadas *et al.*, 2004)

El desarrollo de edema en la pata trasera de la rata después de la inyección de carragenina se ha descrito como un evento en dos fases, en el que diversos mediadores operan en secuencia para producir la respuesta inflamatoria. La histamina, serotonina y bradiquinina son los primeros mediadores detectables en la fase temprana de carragenina inducida inflamación; diversas prostaglandinas (PGs) están involucrados en el aumento de la permeabilidad vascular y son detectables en la fase tardía de la inflamación. La inflamación local y sistémica se asocia con niveles mejorados de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 (Cuzzocrea *et al.* 1999). La fase inicial del edema, que no está inhibida por fármacos no esteroides antiinflamatorios (AINE) como la indometacina o aspirina, se ha atribuido a la liberación de histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) y bradiquinina. La segunda fase de aceleración de la inflamación no sólo se ha correlacionado con la producción de prostaglandinas, pero más recientemente se ha atribuido a la inducción de la ciclooxigenasa inducible (COX-2) en la pata trasera (Nantel *et al.* 1999). Así mismo la carragenina también causa la producción y liberación de óxido nítrico en el sitio de la lesión. (Necas and Bartosikova, 2013)

2.20 MECANISMO DE ACCION DEL ACIDO SALICILICO

El ácido salicílico inhibe irreversiblemente a las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 por acetilación covalente de un residuo de serina en la posición 530 en la COX-1 con inactivación total de la actividad enzimática y la posición 516 en la COX-2 (centro activo de la enzima) con pérdida parcial de la actividad de la ciclooxigenasa (pero se mantiene la síntesis de 15-HETE (15-hidroxieicosatetraenoico). (Cuéllar *et al.*, 2008)

Este efecto inhibidor de la ciclooxigenasa es el que da lugar a los efectos terapéuticos y reacciones adversas. (Posadas *et al.*, 2004). El efecto antitrombótico: La COX-1 presente en las plaquetas produce el tromboxano A2 que es un vasoconstrictor. La COX-1 es muy sensible y por eso se necesitan dosis bajas de ácido salicílico. Al inhibir la COX-1, se produce una disminución de la agregación que aumenta la movilidad de fluidos y leucocitos que causan la inflamación, enrojecimiento y dolor.

3.20.1 EL EFECTO ANALGÉSICO

El ácido salicílico disminuye el dolor porque disminuye la síntesis de prostaglandinas. Es un efecto indirecto sobre el sistema nervioso central.

3.20.2 EFECTO ANTIPIRÉTICO

En el hipotálamo, se inhibe la síntesis de las prostaglandinas que produce vasodilatación periférica y sudoración. La sustitución en el grupo carboxilo o en el hidroxilo modifica la potencia o la toxicidad del ácido salicílico.

2.21 CICLOOXIGENASAS

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico. Las prostaglandinas realizan tanto funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos como con el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias. En 1971, sir John Vane sugirió que el mecanismo más importante de acción de los medicamentos parecidos a la aspirina era la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. Hoy sabemos que la aspirina y otros

antiinflamatorios no esteroides interfieren con la acción de la COX (Vane and Botting, 2003)

3.21.1 CICLOOXIGENASA-1 (COX-1)

La COX-1 desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoïdes para propósitos fisiológicos y regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. En la célula, generalmente la COX-1 se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. Aunque la COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, sus valores cambian durante el desarrollo.

3.21.2 CICLOOXIGENASA-2 (COX-2)

Se encuentra presente normalmente en la célula pero aparece rápidamente tras la exposición de la célula a agentes como lipopolisacáridos o citoquinas proinflamatorias, y regula la producción de los prostanoïdes que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos. En la célula, la COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear. Su aparición en las células puede ser estimulada o inducida en muchos tipos de ellas, incluidas las relacionadas con la respuesta inflamatoria, también se expresa en diferentes tipos de neuronas y participa en la transformación cancerosa, en este caso a través de mecanismos de resistencia a la muerte programada (apoptosis). En células murinas, cuando la actividad de la COX-2 se bloquea, el ácido araquidónico liberado por ciertos estímulos no se puede convertir en prostaglandinas, aunque exista actividad de COX-1 en la célula. (Cuéllar *et al.*, 2008)

2.22 ACIDO SALICILICO

El ácido salicílico es un beta-hidroxiácido con propiedades queratolíticas y antimicrobianas, ampliamente empleado en dermatología por su capacidad de promover la descamación epidérmica a través de la ruptura de los puentes desmosómicos intercelulares y evitar la contaminación por bacterias y hongos oportunistas, también algunos estudios afirman que actúa como regulador de la oleosidad de la piel y como antiinflamatorio potencial. (Cuéllar *et al.*, 2008)

Los fármacos (AINES) son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. (Cuéllar *et al.*, 2008). Otros estudios también afirman que el ácido salicílico es un ingrediente activo de origen natural y es eficaz en el tratamiento del acné debido a su efecto bactericida, antiinflamatorio, y sus propiedades queratolíticas. También se ha demostrado que el ácido salicílico tiene propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. Cuando se usa en combinación con ácido benzoico ha demostrado tener propiedades anti fúngicas. (Royal Society of Chemistry, 2015)

CAPITULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

- Aceite lubricante para motor
- Ácido Clorhídrico HCl
- Ácido salicílico (Sigma-Aldrich Inc.)
- Agua destilada
- Anhídrido metacrílico (Sigma-Aldrich Inc.)
- Bifosfato de sodio (NaH_2PO_4)
- Cloroformo RA A.C.S. Baker
- Diclorometano
- Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA)
- Éter etílico (Sigma-Aldrich Inc.)
- Formaldehído
- Formol tamponado
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO: 15,000
- Metanol (Sigma-Aldrich Inc.)
- Pentobarbital sodico
- Persulfato de amonio (APS)
- Polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMAM)
- Solución salina 0.9% NaCl
- Sulfato de Magnesio anhidro, 99% (MgSO_4)
- Trietilamina (Sigma-Aldrich Inc.)

3.2 EQUIPOS

- Balanza analítica Denver Instrument M-200
- Bomba de adición, RAZEL, Model R-99
- Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Equipo ZetaSizer Nano-ZS series, de marca Malvern Instruments, modelo ZEN3500 con láser verde de 532 nm, serie MAC5000833
- Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter DU 520
- Estufa de vacío WVR
- Liofilizador, Labcono, Equipo Freeze Dry System/Freezone 4.5, cat. No. 7751000
- Parrilla con agitación magnética, VWR, Dyla-Dual
- Potenciómetro HANNA Modelo HI 2210
- Ultracentrífuga, Beckman Coulter, Avanti-JE, modelo J-E, 208/240 v, 24 A, 60Hz
- Máquina de hielo Igloo
- Pletismómetro digital PANLAB HA Harvard LE 7500

3.3 GASES

- Nitrógeno, grado ultra alta pureza (UHP), de INFRA S.A. de C.V.

3.4 SÍNTESIS DE MONÓMERO ÁCIDO METACRILÓILOXI-O-BENZOICO (MAOB)

La síntesis del monómero (MAOB) se realizó mediante un método previamente reportado (Licea-Claveríe, et al. 2003). En un matraz bola de 100 mL se disolvió 6.91 g de ácido salicílico (50 mmol) y 0.49 g (4mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), en 8.42 mL de trietilamina y 20 mL de diclorometano. La solución se colocó en un baño de hielo a 0 °C y se mantuvo con agitación constante, hasta disolver los reactivos sólidos. Posteriormente, se agregó gota a gota 7.50 g de anhídrido metacrílico (50 mmol), por un tiempo controlado de 3 horas, mediante el uso de una bomba de adición. Se agitó la solución durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL y se acidificó hasta un pH=3.0, con HCL, manteniendo la mezcla a 0 °C y con agitación constante. El precipitado obtenido se extrajo con éter etílico, utilizando un embudo de separación de 250 mL; la fase orgánica se lavó con 20

mL de una dilución y 20 mL de agua destilada. La fase orgánica fue secada utilizando MgSO_4 anhidrido, se filtró a vacío y se dejó a cristalizar. El sólido obtenido se lavó con 30 mL de agua a temperatura ambiente y 30 mL a 40 °C, repitiendo tres veces de manera intercalada. El producto se purificó por recristalización utilizando metanol.

3.5 SÍNTESIS DE NANOGELES PEGMA: MAOB

Se utilizó un método de polimerización por emulsión sin detergente para preparar los nanogeles de PEGMA/MAOB, variando diferentes concentraciones del monómero MAOB y PEGMAM, utilizando DVA como entrecruzante. En todas las reacciones de síntesis de nanogeles se utilizó un peso total de 0.50 gramos entre el monómero y comonómero, y utilizando porcentaje (%) molar para el entrecruzante y el iniciador. Todo en un volumen total de 50 mL de agua grado miliQ.

El procedimiento general para la síntesis de los nanogeles PEGMA/MAOB, se describe a continuación:

1. El monómero MAOB, PEGMAM, y el entrecruzante DVA se mezclaron en las cantidades anteriormente mencionadas y se disolvió en 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente para formar un 1w/w solución acuosa.
2. Se eliminó cualquier oxígeno disuelto en la mezcla mediante burbujeó con nitrógeno durante 30 minutos.
3. Después la mezcla de reacción se calentó a 85° C en un baño de temperatura de aceite lubricante y se agitó de manera constante durante 30 minutos.
4. Posteriormente se añadió persulfato de amonio al sistema para actuar como un iniciador térmico. Se dejó que la reacción de polimerización continúe durante 45 minutos.
5. Una vez terminados los 45 min de la reacción de polimerización, se coloca la solución de nanogeles en un matraz Erlenmeyer en un baño de hielo, para bajar la temperatura de la reacción. Posteriormente la solución de nanogeles es sometida al proceso de purificación.

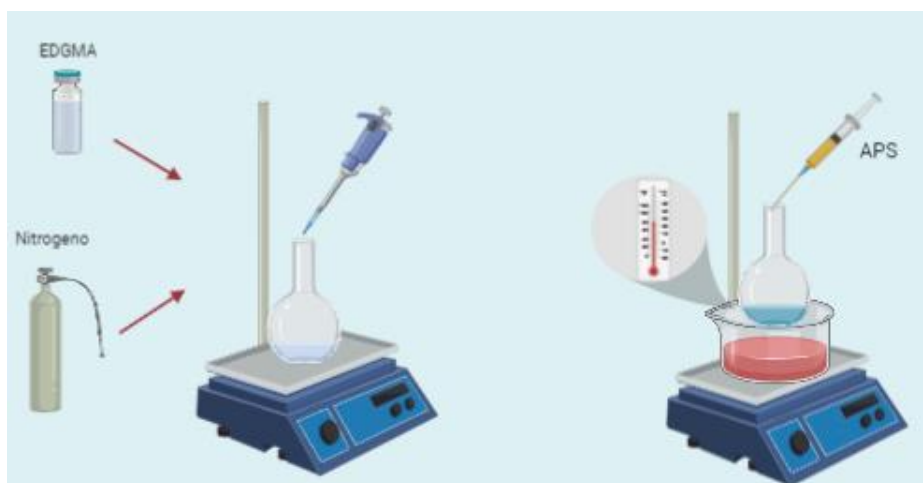


Ilustración 3. Síntesis de nanogeles PEGMA/MAOB

3.6 PURIFICACIÓN DE NANOGELES POR ULTRAFILTRACIÓN

Una vez sintetizadas los nanogeles, estos se filtraron con tubos pall de filtración con membrana de corte de peso molecular de 100 kd, a 3,500 RPM en ultracentrífuga Beckman Coulter, Avanti-JE, modelo J-E. El precipitado se descarta, y el producto concentrado en membrana, se agregaron 15 mL de la muestra de Nanogel y 5 mL de agua desionizada formando una reacción de 20 mL esta fue centrifugada repitiendo este procedimiento de lavado durante 5 ocasiones observando en el precipitado del tubo una solución blanca de aspecto brillante.

3.7 LIOFILIZACIÓN DE NANOGELES

Los nanogeles, se congelaron en viales y se colocaron en el equipo liofilizador Labcono, Equipo Freeze Dry System/Freezone 4.5. El tiempo de liofilización para las muestras fue de 48 horas. Mediante ésta técnica fue posible determinar el porcentaje de rendimiento de los nanogeles. Las muestras después de ser liofilizadas presentan un aspecto similar al algodón y se obtuvo muy poca concentración del mismo, así como para la resuspensión se mira muy afectada la muestra para recuperar sus características físicas y químicas.

3.8 CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES PEGMAM / MAOB

El diámetro hidrodinámico los de nanogeles purificados se determinó mediante DLS utilizando un Zetasizer Nano NS, equipado con un láser verde de 532 nm.

Las muestras se diluyeron utilizando 10 µl de nanogeles y 990 µl de agua grado miliQ. Determinando de esta forma el tamaño de las partículas sintetizadas

3.9 DETERMINACION DEL CONTENIDO ACIDO MEDIANTE TITULACION ACIDO BASE

La determinación del MAOB incorporado en los nanogeles, se realizó mediante titulaciones ácido-base. Con la finalidad de cuantificar la cantidad de ácido incorporado en el núcleo de los nanogeles, se utilizó el método de retro titulación ácido-base. En donde se pesaron 50 mg del producto liofilizado de nanogeles y se colocaron en 5 ml de agua miliQ, que se dejaron en agitación durante 12 horas. Una vez disuelto el material se alcanza el pH a 11.0, con NaOH 0.05 M valorado. Después, se agrega lentamente 25 µl de HCL 0.05 M valorado, hasta llegar a pH 3.0.

3.10 EVALUACION FARMACOLOGICA

Para los estudios con animales se siguieron los procedimientos experimentales de acuerdo con la legislación aplicable sobre normas éticas para investigaciones de dolor experimental en animales, según lo marca la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo del estudio animal fue aprobado por el comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Baja California en la Facultad de Medicina y Psicología campus Otay Tijuana BC. Los animales se alojaron en jaulas tipo rejilla con temperatura y luz controlada con agua y alimentación estándar. Los grupos estaban formados por al menos seis ratas para todos los procedimientos experimentales. Cada animal se usó solo en un ensayo, y después del experimento, se sacrificó con 100 µl de pentobarbital sódico para la toma de muestra sanguínea y la toma de muestra de la zona de lesión para los estudios histopatológicos.

3.11 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se preparó la dilución de formalina al 1% en solución salina (NaCl al 0.9%), al igual que la carragenina 1% que también se suspendió en solución salina, la solución de nanogeles se preparó en las condiciones descritas en el capítulo

anterior todos los tratamientos fueron recién preparados antes de cada experimento y administrado localmente en una concentración de 1 mg/Kg de peso de cada animal tratado el volumen de la formalina y carragenina fue de 50 μ L después de 24 horas de la aplicación de los tratamientos.

En la prueba de formalina y carragenina, el fármaco de referencia utilizado como control es ácido salicílico y se utilizó a una concentración de 1 mg/ml el procedimiento se desarrolló como a continuación se describe.

3.12 APLICACIÓN DE CONTROLES Y TRATAMIENTOS

Se realizó la aplicación de tratamientos y controles bajo condiciones controladas de temperatura, manteniendo una temperatura de 25°C se llevó a cabo la administración de los nanogeles PEGMA/MAOB y los controles tanto de ácido salicílico como de solución salina fisiológica 0.9% los animales se colocaron en jaulas tipo rejilla donde se mantuvieron con alimentación controlada, se pesaron en una balanza mecánica ohaus 730-00 y se distribuyeron en grupos de tratamiento y controles, una vez conociendo el peso de cada rata se les aplicó vía intravenosa 1 miligramo del tratamiento por kilogramo de peso de los animales, la administración se hizo en la vena caudal y se dejaron los animales en condiciones controladas para que de manera profiláctica sea liberada la concentración de los fármacos administrados en las ratas estudiadas, asimismo a las 24 horas se realizaron las pruebas de dolor con formalina 1% y el efecto antiinflamatorio con carragenina 1%

- Seleccionar 24 ratas macho para el análisis de la prueba de formalina 1%.
- Se dividieron en 3 grupos de trabajo de 8 ratas cada grupo identificados como color rojo (grupo solución salina); color verde (grupo ácido salicílico); color azul (grupo nanogeles)
- Las ratas se pesaron en una balanza mecánica tipo deslizante OAHUS triple brazo, serie 730-00
- Los animales fueron sedados introduciéndolos en un vaso de precipitado de 1.0 litros el cual contiene algodón empapado en cloroformo.

- Administrar los tratamientos en una dosis de 1 mg/kg de peso cada grupo de ratas recibirán sus respectivos tratamientos en la vena caudal.
- Dejar los 3 grupos en las mismas condiciones de alimentación, luz, temperatura durante 24 horas.

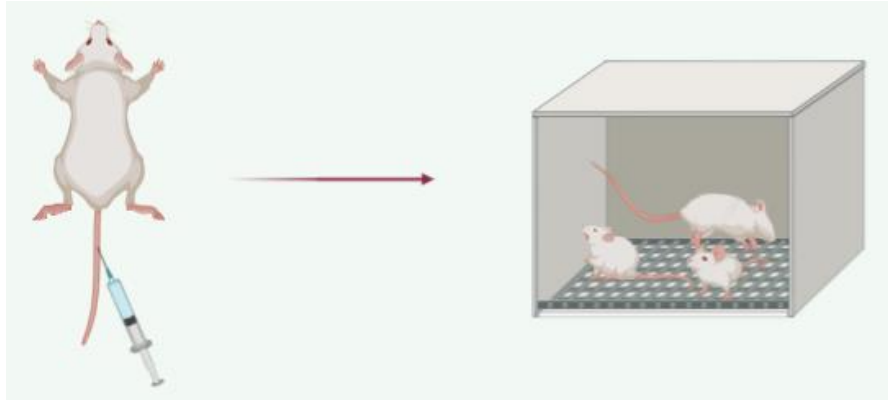


Ilustración 4. Aplicación de tratamientos experimentales

3.13 PRUEBA DE DOLOR INDUCIDO CON FORMALINA AL 1%

El dolor fue inducido por medio de la prueba de formalina en ratas como anteriormente se describió. Los comportamientos nociceptivos se cuantificaron como el número de retrocesos o flexiones de la extremidad inyectada con 50 μ L de formalina 1% en el transcurso de 1 h se contabilizó el número de contracciones de cada rata durante el primer minuto en intervalos de cada 5 minutos durante una hora. En este procedimiento los animales fueron colocados en cilindros de PVC de 40 cm de alto por 20 cm de diámetro con espejos bilaterales para la observación de los movimientos de la extremidad administrada en todos sus ángulos, asimismo las contracciones de las ratas fueron contabilizadas con un contador de mano H-7350 traduciendo cada contracción de la extremidad como una muestra de dolor en la rata tratada, a continuación se describe paso a paso el desarrollo de la prueba de formalina:

- Los grupos de ratas que se mantienen en observación son sometidos a la prueba de formalina
- Inmovilizar la rata dejando libre únicamente la extremidad inferior derecha

- Utilizando una jeringa de insulina de 100 unidades inyectar 50 µL de formalina 1% formándose un habón dérmico en la zona administrada
- Colocar la rata en el cilindro de evaluación farmacológica, donde será observada con espejos bilaterales para contabilizar todos sus movimientos
- Contabilizar el número de contracciones de la extremidad administrada en la rata durante el primer minuto.
- Contabilizar el primer minuto de intervalos de cada 5 minutos durante una hora.

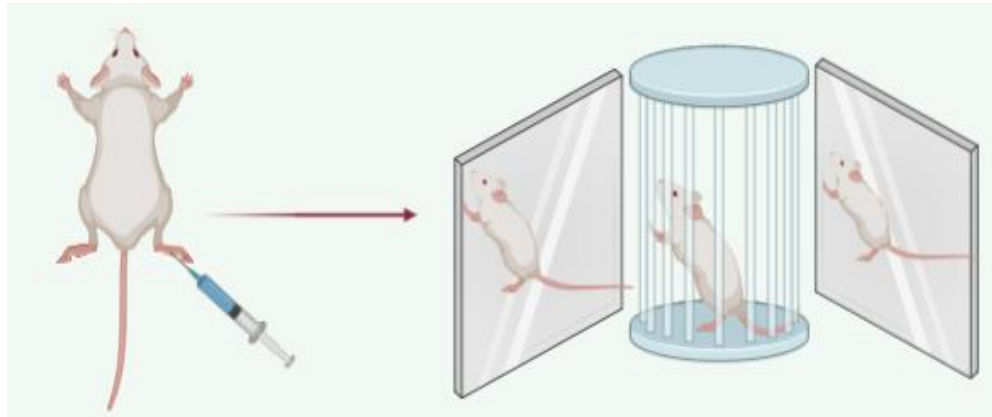


Ilustración 5. Prueba de dolor inducido con formalina 1%

3.14 PRUEBA DEL EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA AL 1%

Las ratas recibieron una inyección subplantar de 50 µL de carragenina al 1% en la extremidad posterior derecha, el aumento del volumen de la pata se midió mediante un método de desplazamiento de volumen utilizando un pletismómetro digital PANLAB HA Harvard LE 7500 inmediatamente antes de la inyección de carragenina y luego a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 horas. El edema se expresó como el aumento del volumen en mililitros de la pata después de la inyección de carragenina en relación con la pata basal para cada animal. El porcentaje del aumento de volumen se calculó de la siguiente manera:

$$\%Vol\ antiinflamatorio - Vol\ inflamatorio = \left(1 - \frac{a - x}{b - y}\right) * 100$$

Donde 'x' y 'a' son el volumen medio de la pata de las ratas en el grupo de prueba antes y después de la inyección de carragenina, respectivamente, y "y" y "b" son el volumen medio de la pata de la rata antes y después de la inyección de carragenina en la pata basal usada como control, respectivamente.

- Los grupos de ratas que se mantienen en observación son sometidos a la prueba de inflamación con carragenina 1%
- Preparar solución salina 1% adicionada con una gota de tritón para el llenado de los cilindros de lectura del pletismometro.
- Inmovilizar la rata dejando libre únicamente la extremidad inferior derecha
- Medir el volumen de la extremidad izquierda o extremidad basal la cual servirá como referencia para comparación de la extremidad tratada.
- Utilizando una jeringa de insulina de 100 unidades inyectar 50 μ L de carragenina 1% en la extremidad inferior derecha, formándose un habón dérmico
- Medir el volumen de aumento de la extremidad tratada a la hora 1, 2, 3, 4, 5, 6 24 y 48 horas.
- Colocar la rata en la jaula tipo rejilla, donde permanecerá durante las tomas de lecturas en el pletismómetro
- Registrar los datos del pletismómetro.

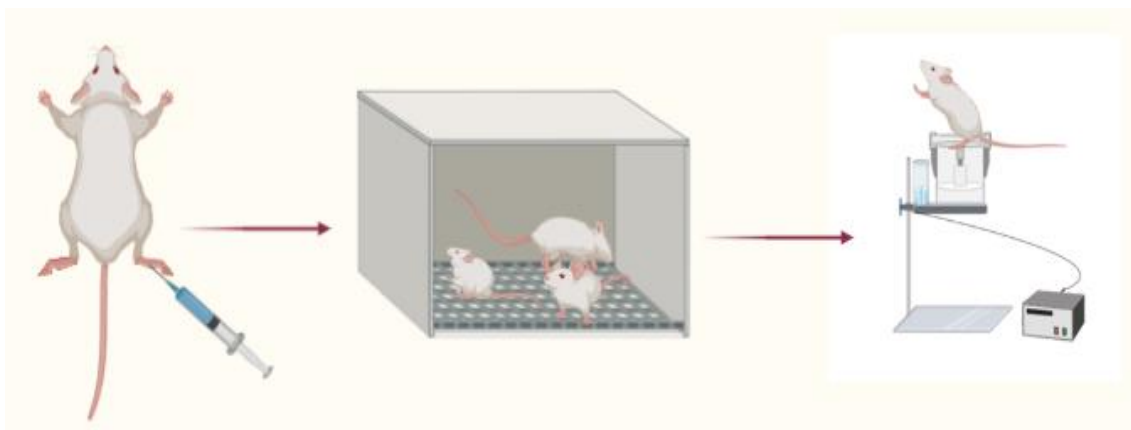


Ilustración 6. Prueba de inflamación inducido con carragenina 1%

3.15 TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Una vez desarrolladas las pruebas de dolor y de inflamación se procedió a realizar la toma de muestras biológicas para esto se tomaron muestras sanguíneas por punción cardíaca en tubos vacutainer morados adicionados con EDTA para cuantificar mediadores inflamatorios por medio de la técnica molecular ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y muestras histológicas fijándose en formol tamponado para realizar cortes histológicos de la zona de lesión donde se le fue inducido el dolor y la inflamación respectivamente.

- Los animales recibieron una inyección vía intraperitoneal de 100 μ L de pentobarbital sódico
- Se mantienen en observación durante 3 minutos, mientras son sacrificadas.
- Realizar la disección de la rata procediendo a la toma de muestra por punción cardíaca
- Puncionar el corazón con una jeringa de 5 ml
- Una vez canalizada la vena aorta la muestra sanguínea ingresar la aguja acoplada a la jeringa con el bisel hacia arriba, moviendo la cámara si es necesario, para evitar formación de coágulos que puedan interrumpir el flujo venoso.
- Retraer el émbolo lentamente. Si fluye la sangre a través de aguja a la cámara de la jeringa, tomar la muestra de sangre. Caso contrario, retirar la aguja y elegir otro sitio de punción.
- Retirar la aguja.
- Pasar la muestra a un tubo vacutainer
- Tomar muestra de tejido de la zona de lesión.
- Limpiar el excedente de pelo de la zona de lesión, usando un bisturí tipo escalpelo
- Colocar el tejido en un tubo eppendorf con formalina tamponada.

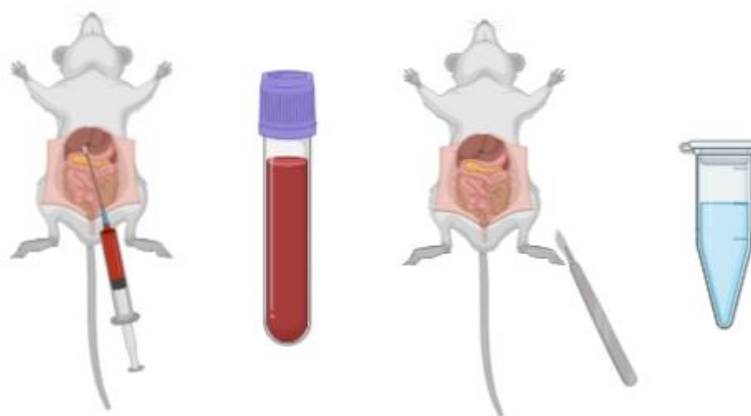


Ilustración 7. Toma de muestra sanguínea por punción cardiaca y toma de muestra histológica.

3.16 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.16.1 Centrifugación

Los tubos vacutainer con 3ml de muestra sanguínea fueron centrifugados en una centrifuga clínica Thermo scientific centra CL2 a 3500 RPM durante 5 minutos según lo marca la NOM-062-ZOO-1999 para la correcta separación de los componentes celulares y acelulares, mismos que posteriormente se pasaron a un tupo eppendeorf con una pipeta pasteur para almacenarlos a temperatura de -30°C

3.16.2 Obtención de la muestra histológica:

Las muestras histológicas fueron tomadas cuidadosamente del sitio de lesión y fijadas en formol tamponado al 10% se procesaron en un histoquinete Thermo scientific Microm STP 120 pasando por 10 recipientes de solventes para permitir el proceso de deshidratación de la muestra, las cuales después de 10 horas de procesamiento se fijaron en bloques de parafina PARABATH de 3 X 2 cm haciendo cortes histológicos de 3 um en un micrótopo termo scientific HM 325 fijando los cortes en laminillas de cristal para concluir con una tinción de Hematoxilina – Eosina.

3.16.3 Fijación:

Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml fijadas en formol tamponado al 10% para procesamiento histológico y para mantener la integridad de la muestra en el transporte y el tiempo de almacenamiento, asimismo, el formol tamponado mantiene suspendido el metabolismo celular del tejido, impide la degradación celular y elimina los microorganismos patógenos que se pueden encontrar en el microambiente, tales como hongos, bacterias y virus.

3.16.4 Deshidratación de la muestra

La deshidratación es el proceso de extracción de líquidos citoplasmáticos en la célula se llevó a cabo en el histoquinete Thermo scientific Microm STP 120 manteniendo su forma y su estructura celular, en este procedimiento las muestras se colocan en cassettes para procesamiento histológico M490 en el cual fueron colocadas todas las muestras en el porta muestras del histoquinete Thermo scientific Microm STP 120 de acuerdo al siguiente protocolo de procesamiento:

- 1 hora 70% de alcohol
- 1 hora 80% de alcohol
- 1 hora 95% de alcohol
- 1 hora 95% de alcohol
- 1 hora alcohol puro
- 1 hora xileno
- 1 hora xileno
- 1 hora xileno
- 90 minutos parafina
- 90 minutos parafina

3.16.5 Inclusión en parafina:

La inclusión de las muestras histológicas se hizo en el equipo Tissue-Tek auto TEC 5, donde las muestras se colocaron en un molde de acero Inoxidable para Histología Simport, manteniendo una temperatura controlada de la parafina de 45°C se preparó el bloque de parafina llenando el molde con la muestra en el porta cassette, se pasa por un proceso de enfriamiento y se mantiene refrigerado el molde con la muestra durante 5 horas para permitir que el bloque despegue fácilmente del molde.

3.16.6 Corte histológico en micrótopo:

Los bloques de parafina se colocaron en la base de corte del micrótopo rotativo manual – RM2125 y se hicieron cortes histológicos de 3 µm, se pasaron a un baño con agua a 69°C y se pescó la muestra histología para posteriormente ponerse en un horno termo científico LGO a 70°C para fijar correctamente la muestra a la laminilla.

3.16.7 Tinción Eosina-Hematoxilina de muestras histológicas:

El proceso de tinción se llevó a cabo en un tren de tinción establecido para el manejo de tintes en el laboratorio de histopatología teniendo en cuenta de que los tejidos animales son en su gran mayoría incoloros, excepto aquellos que poseen algún tipo de pigmento, se realizó la tinción eosina – hematoxilina la cual se desarrolló teniendo en cuenta el siguiente protocolo

- Una vez teniendo el corte en la laminilla colocar la laminilla en 2 baños de xileno durante 10 minutos cada uno.
- Hacer 3 baños de alcohol puro de 15 inmersiones en cada recipiente.
- Lavar durante 2 minutos con agua corriente.
- Teñir durante 5 minutos en hematoxilina
- Diferenciar con una inmersión rápida en alcohol - ácido clorhídrico al 1%
- Lavar durante 2 minutos en agua corriente con poca fuerza de agua.
- Teñir durante 1 minuto en eosina
- Lavar durante 1 minuto en agua corriente y terminar con 5 baños de alcohol
- Finalizar con un baño de xileno durante 30 segundos

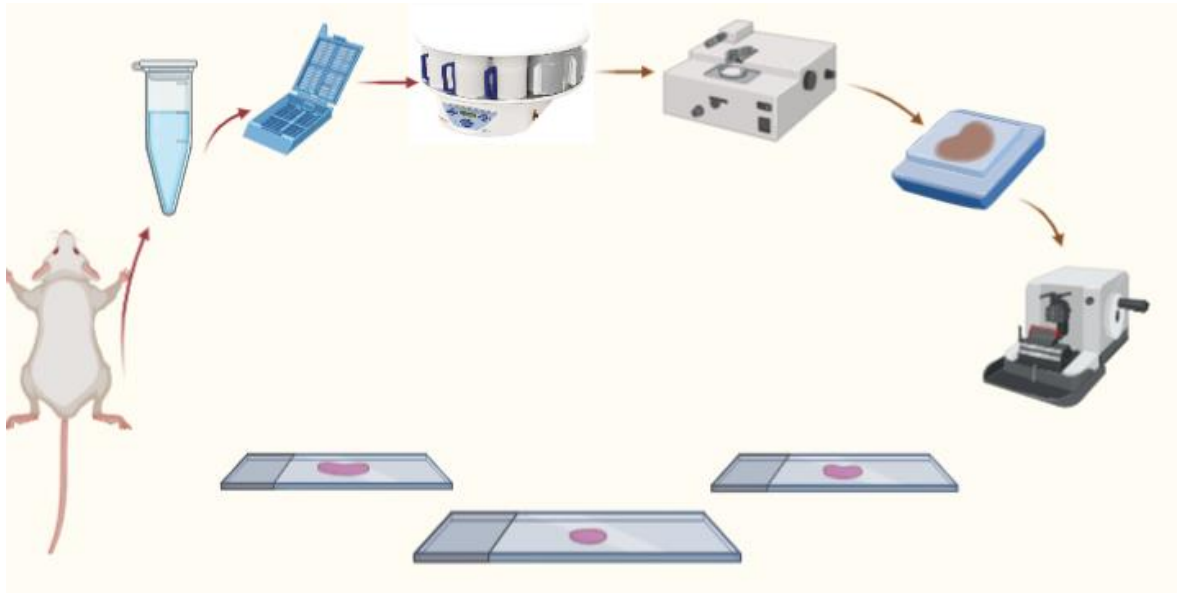


Ilustración 8. Esquema general del procesamiento histológico

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SÍNTESIS DEL MONÓMERO ÁCIDO METACRILÓILOXI-O-BENZOICO (MAOB)

El monómero MAOB se sintetizó de acuerdo a la técnica de síntesis reportada por Claverie Licea et al, 2003, obteniéndose un sólido blanco del cual se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 58% la estructura química del monómero MAOB, consiste en la unión de ácido salicílico con el anhídrido metacrilato el cual contiene grupos característicos que aseguran la formación del monómero, como lo es el grupo éster, anillo aromático y ácido carboxílico.

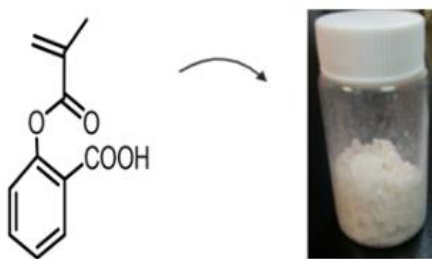


Ilustración 9. Monómero MAOB

4.2 SÍNTESIS DE NANOGELES PEGMAM/MAOB 80-20

Para la síntesis de nanogeles PEGMA-MAOB se tomó como referencia la concentración que demostró el mejor efecto de liberación *in vitro* del trabajo de síntesis de nanogeles de metacrilato de ácido salicílico: Estudio de la hidrólisis del fármaco de Rodríguez et al 2016. Los nanogeles obtenidos en los experimentos, se caracterizaron vía DLS, obteniendo tamaños de partículas entre 180 y 190 nm.

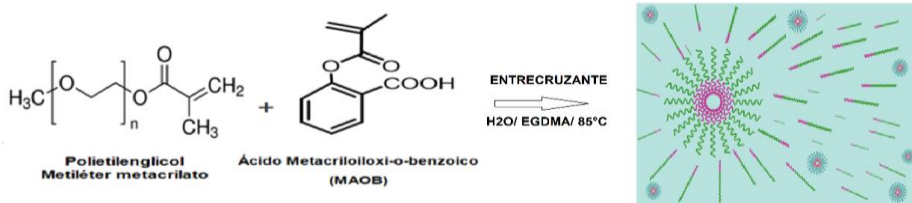


Ilustración 10. Entrecruzamiento de nanogeles PEGMA/MAOB

4.3 CARACTERIZACIÓN DE MONÓMERO ÁCIDO METACRILILOXI-O-BENZOICO (MAOB)

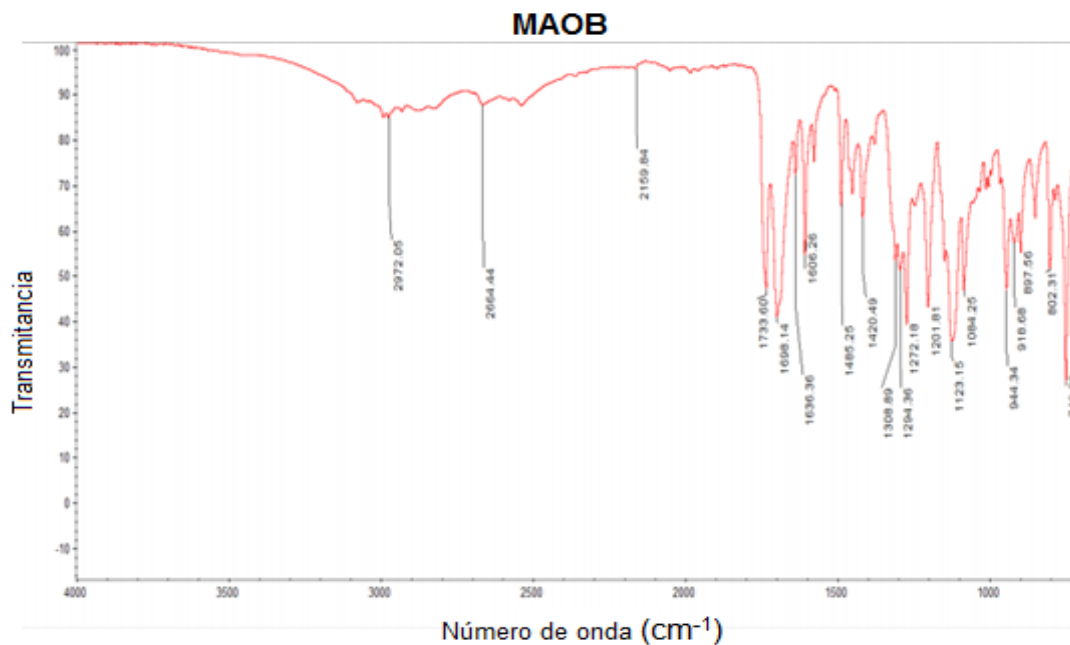


Ilustración 11. FTIR del MAOB

De acuerdo a la literatura reportada por (Claverie Licea et al, 2003) se pueden apreciar las bandas características del MAOB; a 3079 cm⁻¹ se observó una banda correspondiente al estiramiento =C-H de la región aromática del monómero, a 1734 cm⁻¹ indicando la vibración del estiramiento C=O del carbonilo del éster, a 1694 cm⁻¹ una banda relativa al estiramiento C=O del carbonilo del ácido carboxílico, a 1606 cm⁻¹ se observa el estiramiento correspondiente a H₂C=C de la zona vinílica.

4.4 BANDAS ELECTROSCOPICAS DE INFRAROJO PARA EL MONOMERO MAOB.

Grupo Funcional	FT-IR (cm ⁻¹)
=C-H (aromático)	3079
C=O (éster)	1734
C=O (ácido)	1694
H ₂ C=C	1606
C-O	1274 y 1124
Orto di sustitución	749

Tabla 1. Grupos funcionales del MAOB

4.5 CARACTERIZACION DE NANOGELES PEGMA/MAOB

PEGMA/MAOB (%W/W)	ENTRECRUZANTE % MOL	INICIADOR % MOL	Dh NANOMETROS	PDI
80:20	EGDMA	5%	220	0.195
80:20	EGDMA	5%	210	0.177
80:20	EGDMA	10%	182.9	0.051

Tabla 2. Caracterización del MAOB

Los nanogeles sintetizados por polimerización por emulsión sin detergente fueron caracterizados mediante DLS obteniéndose tamaños de partículas de entre 182.9 y 220 nanómetros, los resultados se pueden ver en la tabla.

4.6 PURIFICACION DE NANOGELES PEGMA/MAOB

La solución de nanogeles se filtró con membrana de corte de peso molecular de 100 kd, a 3,500 RPM en ultracentrífuga Beckman Coulter, Avanti-JE, modelo J-E. El precipitado se descarta, se agregaron 15 mL de la muestra de Nanogel y 5 mL de agua desionizada formando una reacción de 20 mL ésta fue centrifugada repitiendo este procedimiento de lavado durante 5 ocasiones observando en el precipitado del tubo una solución blanca de aspecto brillante.

PEGMA/MAOB (%W/W)	ENTRECRUZANTE % MOL	VOLUMEN INICIAL	VOLUMEN FINAL
80:20	EGDMA	15	12
80:20	EGDMA	15	10
80:20	EGDMA	15	10

Tabla 3. Purificación de Nanogeles PEGMA/MAOB

4.7 LIOFILIZACION DE NANOGELES PEGMAM / MAOB

Los nanogeles purificados se congelaron a temperatura de -5°C para ser liofilizados, una vez transcurridas las 48 horas en el proceso e liofilización se obtuvo un material blanco esponjoso. A partir de este procedimiento, se logró obtener el rendimiento de los nanogeles, el cual se puede observar en la siguiente tabla

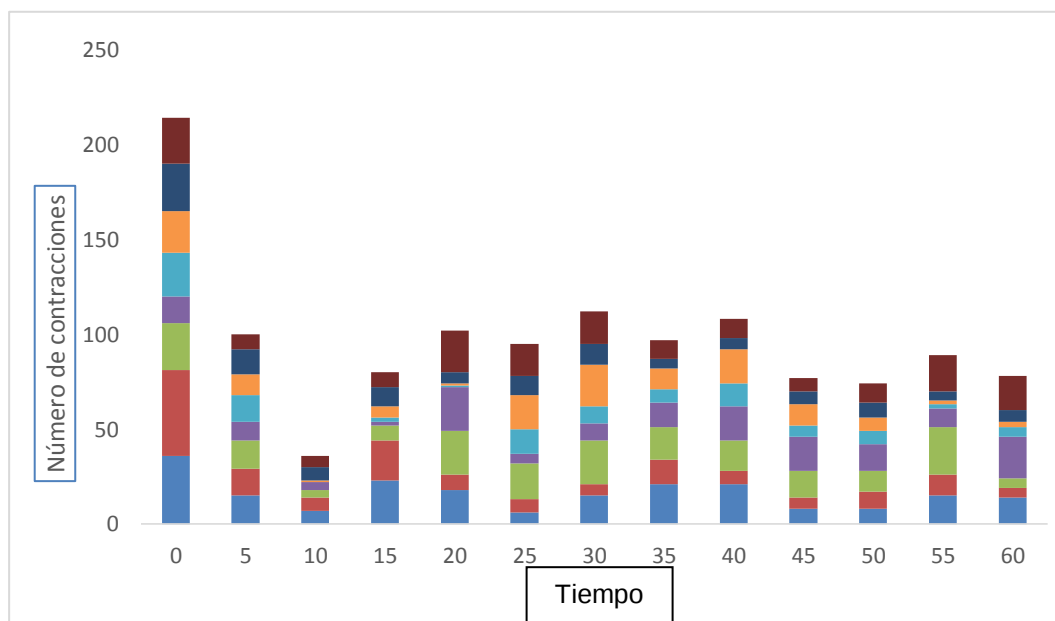
PEGMA/MAOB (%W/W)	NANOGELES	INICIADOR	% RENDIMIENTO
80:20	PEGMA/MAOB	APS	28.07
80:20	PEGMA/MAOB	APS	33.55
80:20	PEGMA/MAOB	APS	25.03

Tabla 4. Liofilización de Nanogeles PEGMA/MAOB

4.8 PRUEBA DE DOLOR INDUCIDO CON FORMALINA 1% A LAS 24 HORAS

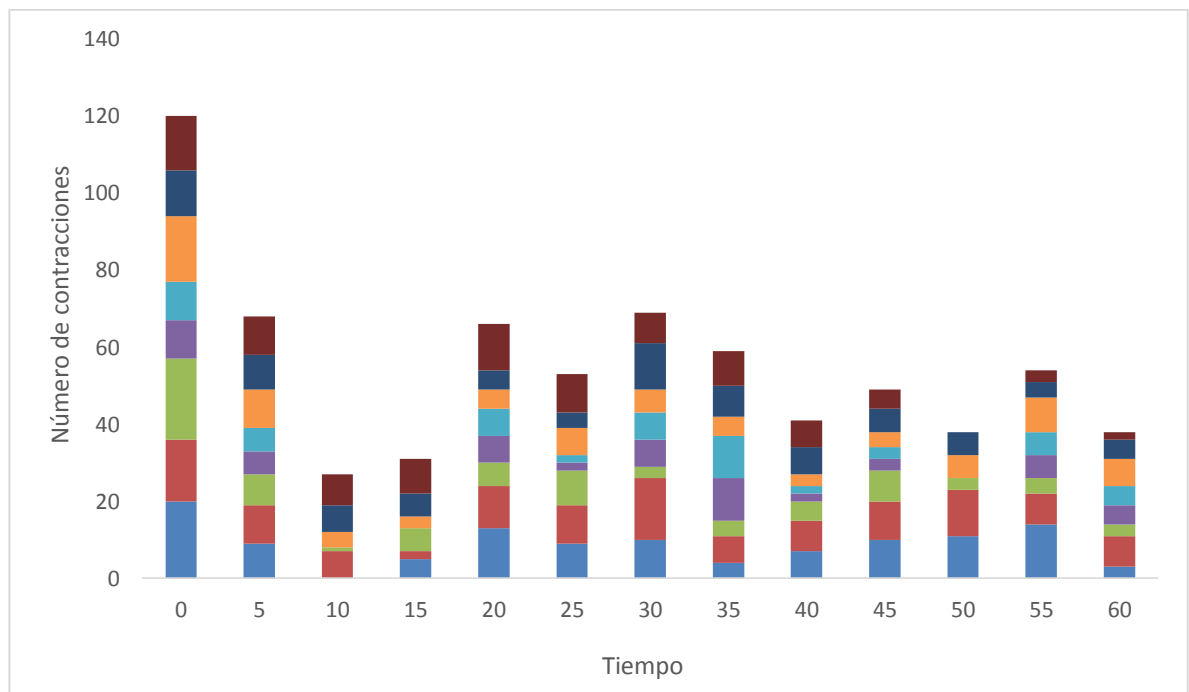
4.8.1 Grupo solución salina

En el primer estudio de la prueba de dolor inducido con formalina al 1% se trataron 24 ratas las cuales se dividieron en 3 grupos de 8 ratas cada uno, el presente grafico representa las medidas de dolor para el grupo de ratas que se les administró solución salina y se les indujo dolor con formalina a las 24 horas, registrando así una cantidad de 1262 contracciones traducidas a muestras de dolor producto de la formalina, mismas que el mayor número de estas se registraron en la lectura de 0 – 1 minuto de tiempo, es decir, en la primera lectura con un registro de 214 contracciones, la menor muestra de dolor se manifestó en la tercer lectura en el tiempo de 10 – 11 minutos, con registro de solamente 36 contracciones, asimismo, el animal que registra menos dolor en esta prueba es la rata número 5 con un registro de 101 contracciones en el transcurso de toda la prueba y un peso de 207 gramos, la rata que registra el mayor número de contracciones es la rata número 1 con un registro de 207 contracciones y un peso de 180 gramos.



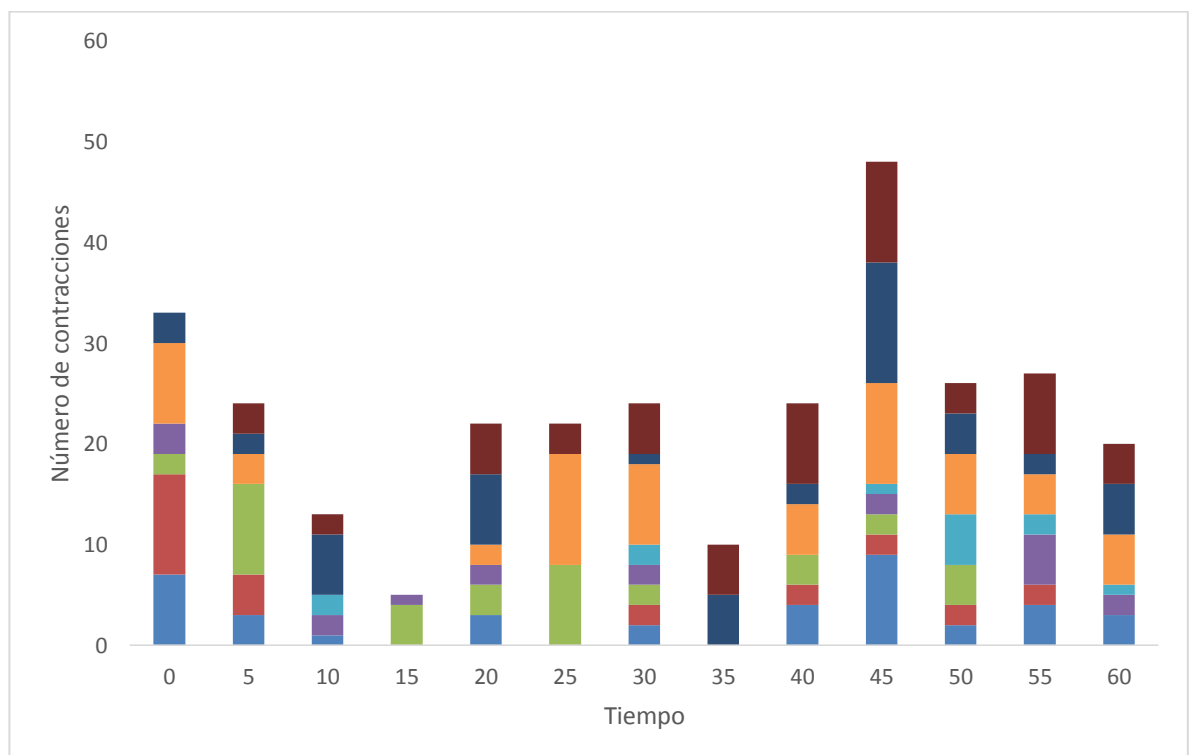
4.8.2 Grupo ácido salicílico:

El presente grafico representa las medidas de dolor para el grupo de ratas que se les administró ácido salicílico en una concentración de 1 mg/ ml y se les indujo dolor con formalina a las 24 horas, registrando así una cantidad de 713 contracciones traducidas a muestras de dolor producto de la inyección con formalina formalina 1%, donde el mayor número de contracciones se registraron en el tiempo de 0 – 1 minuto de tiempo, es decir, en la primera lectura con un registro de 120 contracciones, la menor muestra de dolor se manifestó en la tercer lectura nuevamente en el tiempo de 10 – 11 minutos, con registro de 27 contracciones, asimismo, el animal que registra menos dolor en esta prueba es la rata número 4 y 5 con un registro de 59 contracciones ambas en el transcurso de toda la prueba y un peso de 220 y 210 gramos respectivamente, la rata que registra el mayor número de contracciones es la rata número 2 con un registro de 125 contracciones y un peso de 185 gramos.



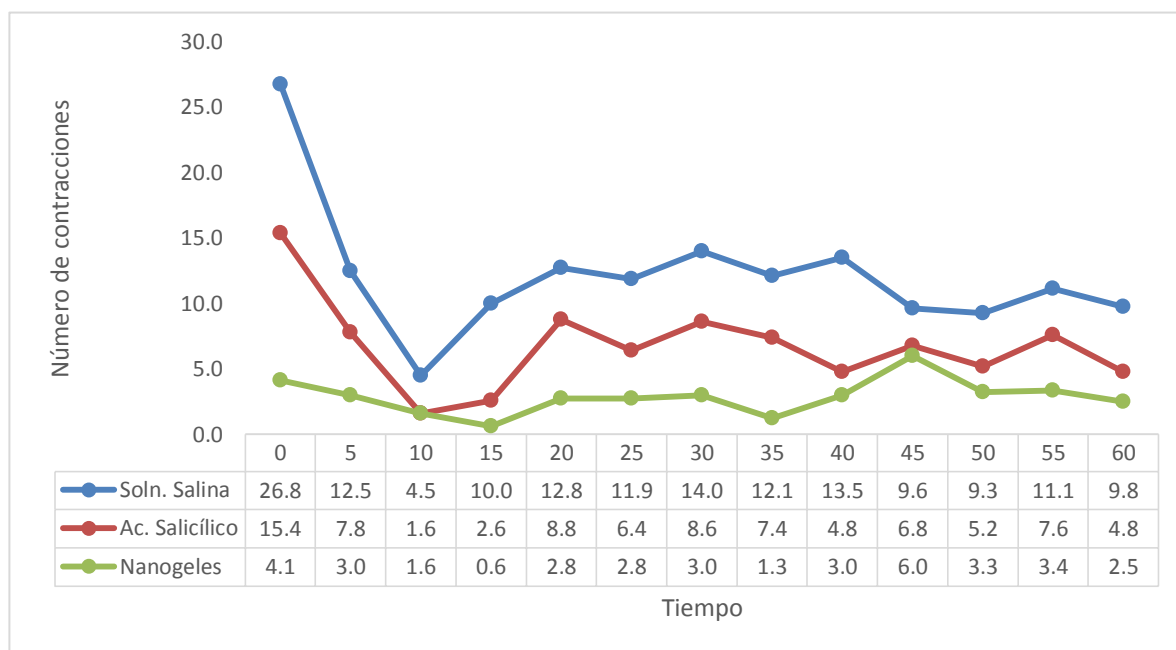
4.8.3 Grupo nanogeles PEGMA-MAOB 80/20:

El presente grafico representa las medidas de dolor para el grupo de ratas que se les administró nanogeles PEGM-MAOB en una concentración de 1 mg/ ml y se les indujo dolor con formalina a las 24 horas, registrando así una cantidad de 298 contracciones traducidas a muestras de dolor producto de la inyección con formalina formalina 1%, donde el mayor número de contracciones se registraron en el tiempo del minuto 45 – 46 es decir, en la lectura número 10 con un registro de 48 contracciones, la menor muestra de dolor se manifestó en la cuarta lectura en el tiempo del minuto 15 – 16 con registro de 5 contracciones, asimismo, el animal que registra menos dolor en esta prueba es la rata número 5 con un registro de 13 contracciones en el transcurso de toda la prueba y un peso de 210 gramos la rata que registra el mayor número de contracciones es la rata número 6 con un registro de 62 contracciones y un peso de 217 gramos.

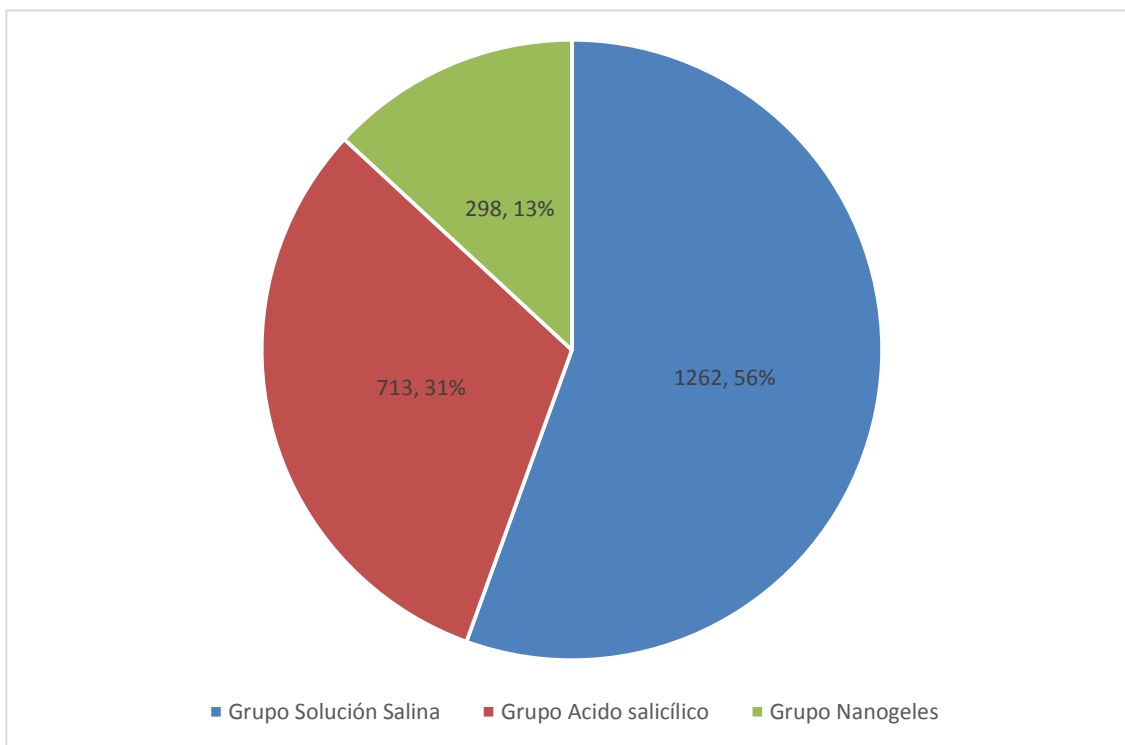


4.9 PROMEDIOS PRUEBA DE DOLOR CON FORMALINA 1% A LAS 24 HORAS.

En el presente grafico se muestran los promedios por cada grupo de trabajo en la prueba de dolor inducido con formalina donde se aprecia en general en toda la prueba un claro incremento entre los dos controles tanto de ácido salicílico y solución salina fisiológica 0.9%, asimismo se logra establecer un punto en común entre el ácido salicílico y el grupo nanogeles en el tiempo numero 3 el grupo de nanogeles permanece durante toda la prueba con un número menor de muestras de dolor comparado con sus dos controles de referencia, marcados en color azul y rojo.



4.10 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA PRUEBA DE DOLOR INDUCIDO CON FORMALINA 1% n=24

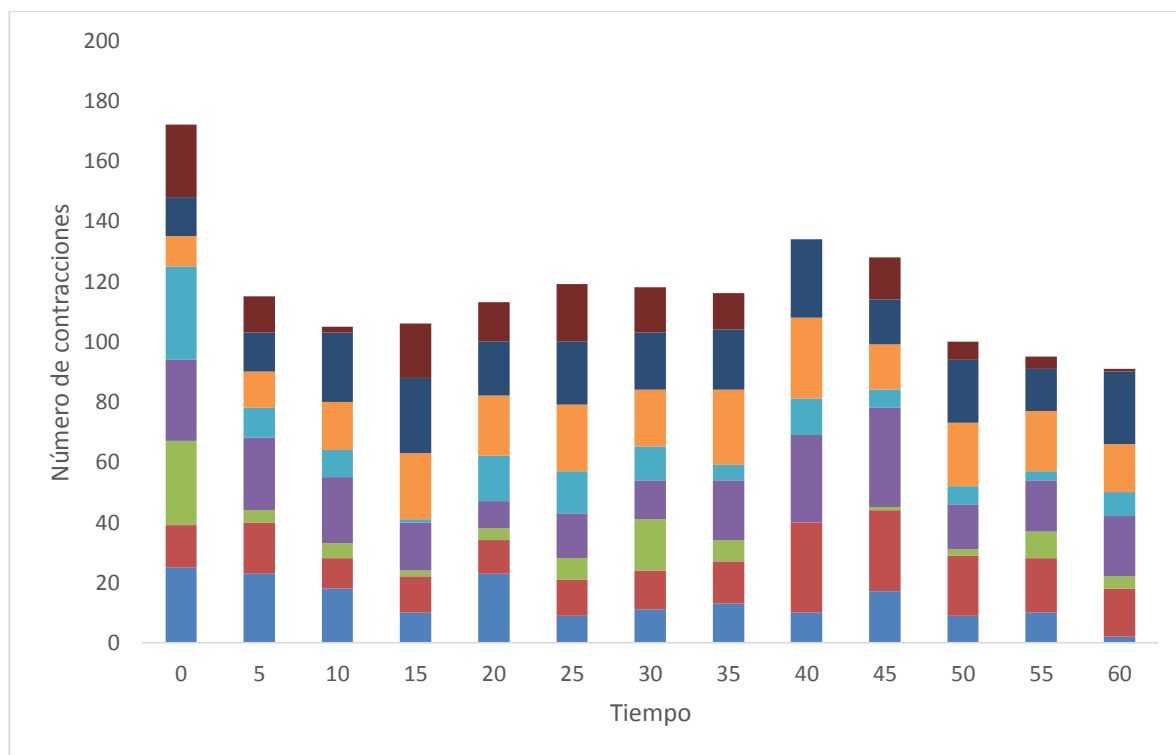


En la presente grafica se puede apreciar como la distribución de las contracciones traducidas como muestras de dolor en ratas se mantienen con un porcentaje del 56% en el grupo solución salina, con un número total de 1262 contracciones durante toda la prueba en los 8 animales estudiados, por consiguiente el grupo ácido salicílico mantiene un porcentaje del 31% con 713 contracciones y finalmente el grupo de nanogeles PEGMA-MAOB únicamente con un 13% con 298 contracciones totales en los animales estudiados.

4.11 PRUEBA DE DOLOR INDUCIDO CON FORMALINA 1% A LAS 48 HORAS:

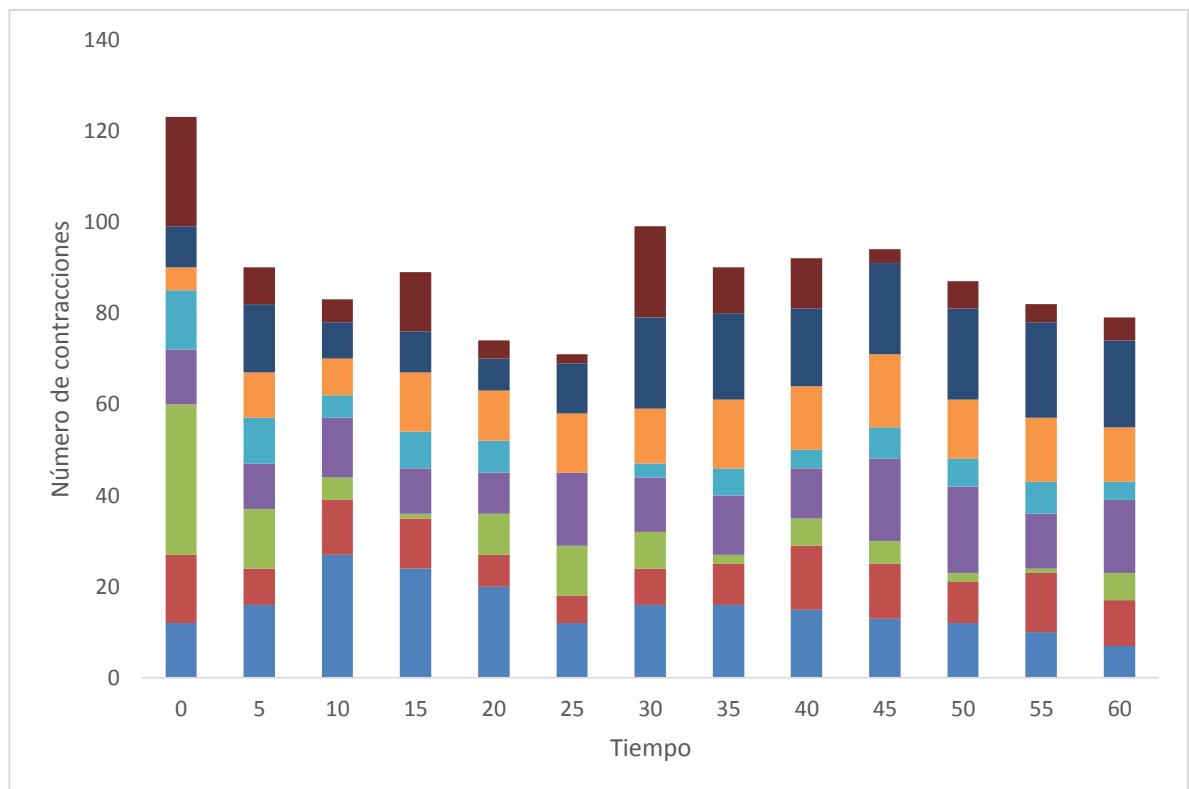
4.11.1 Grupo solución salina:

En el estudio de la prueba de dolor inducido con formalina al 1% y su estudio de liberación farmacológica a las 48 horas se trataron 24 ratas las cuales se dividieron en grupos de 8 ratas cada uno, el presente grafico representa las medidas de dolor para el grupo de ratas que se les administró solución salina y se les indujo dolor con formalina a las 48 horas, registrando así una cantidad de 1512 contracciones traducidas a muestras de dolor producto de la formalina, mismas que el mayor número de estas se registraron en el tiempo de 0 – 1 minuto de tiempo, es decir, en la primera lectura con un registro de 172 contracciones, la menor muestra de dolor se manifestó en la última lectura en el tiempo de 60 – 61 minutos, con registro de solamente 91 contracciones, asimismo, el animal que registra menos dolor en esta prueba es la rata número 3 con solamente un registro de 90 contracciones en el transcurso de toda la prueba y un peso de 261 gramos, la rata que registra el mayor número de contracciones es la rata numero 4 acumulando la cantidad de 260 contracciones y un peso de 226 gramos.



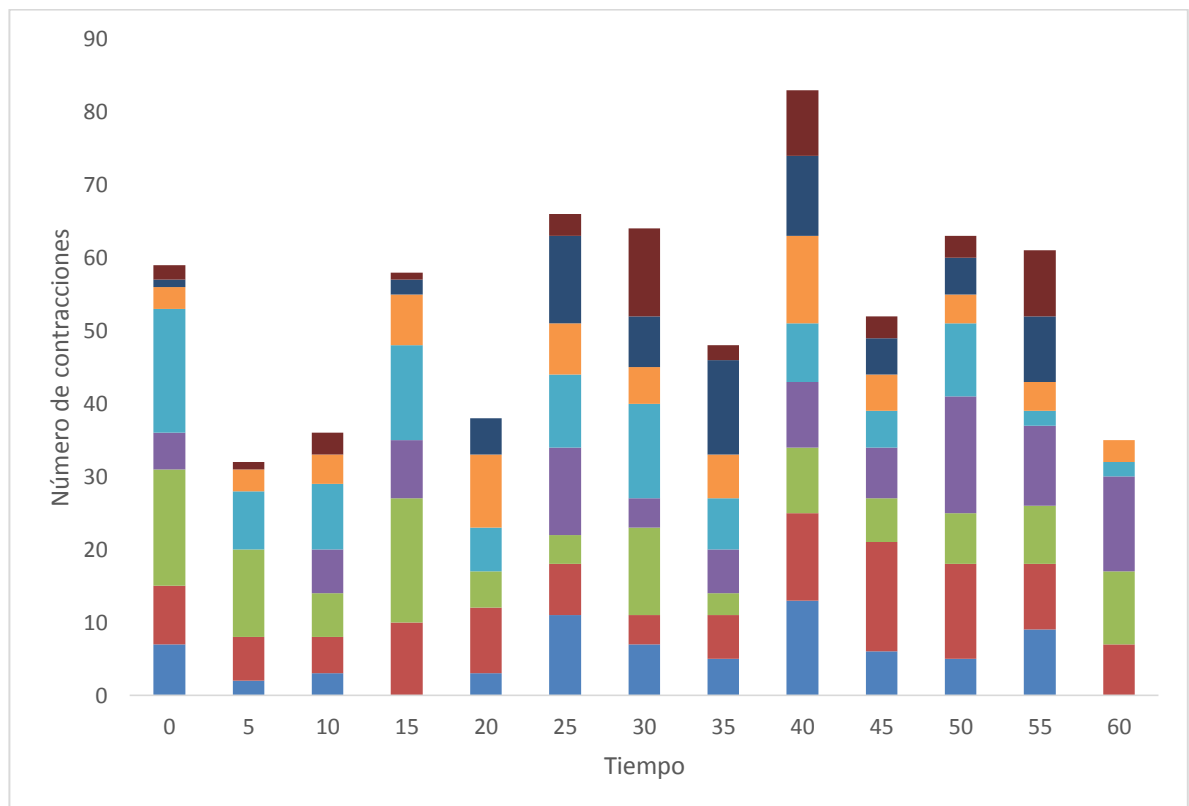
4.11.2 Grupo ácido salicílico

En el estudio de la prueba de dolor inducido con formalina al 1% y su estudio de liberación farmacológica a las 48 horas se trataron 8 ratas para el grupo que fue administrado con ácido salicílico en una concentración de 1mg/ml en el presente grafico se representan las medidas de dolor para este grupo de ratas que y se les indujo dolor con formalina a las 48 horas, registrando así una cantidad de 1153 contracciones traducidas a muestras de dolor producto de la formalina, mismas que el mayor número de estas se registraron en el tiempo de 0 – 1 minuto de tiempo, es decir, en la primera lectura con un registro de 123 contracciones, la menor muestra de dolor se manifestó en el tiempo de 25 – 26 minutos, con registro de 71 contracciones, asimismo, el animal que registra menos dolor en esta prueba es la rata número 5 con solamente un registro de 80 contracciones en el transcurso de toda la prueba y un peso de 161 gramos, la rata que registra el mayor número de contracciones es la rata numero 1 acumulando la cantidad de 200 contracciones y un peso de 146 gramos.



4.11.3 Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 80/20

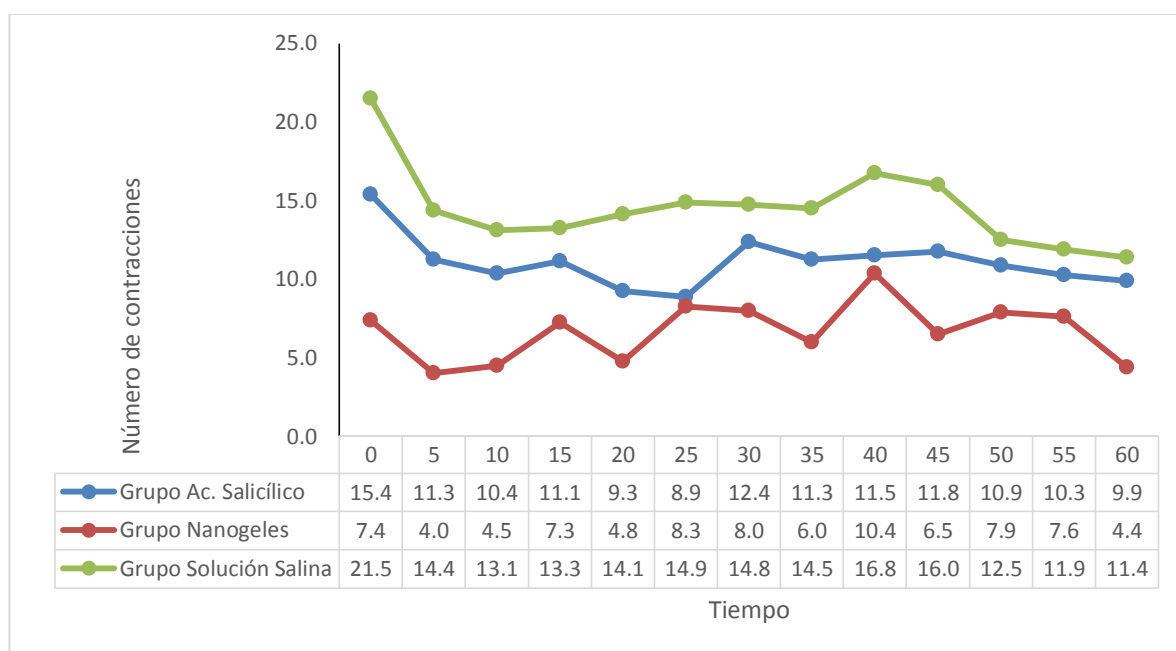
En el estudio de la prueba de dolor inducido con formalina al 1% y su estudio de liberación farmacológica a las 48 horas se trataron 8 ratas para el grupo que fue administrado con nanogeles PEGMA-MAOB 80/20 en una concentración de 1mg/ml en el presente grafico se representan las medidas de dolor para este grupo de ratas que se les indujo dolor con formalina a las 48 horas, registrando así una cantidad de 695 contracciones traducidas a muestras de dolor producto de la formalina, de las cuales el mayor número de muestras de dolor se registraron en el tiempo de 40 – 41 minutos, es decir, en la novena lectura con un registro de 83 contracciones, la menor muestra de dolor se manifestó en la segunda lectura en el tiempo de 5 – 6 minutos, con registro de 32 contracciones, asimismo, el animal que registra menos dolor en esta prueba es la rata número 8 con un registro de 48 contracciones en el transcurso de toda la prueba y un peso de 170 gramos, la rata que registra el mayor número de contracciones es la rata numero 3 acumulando la cantidad de 115 contracciones y un peso de 180 gramos.



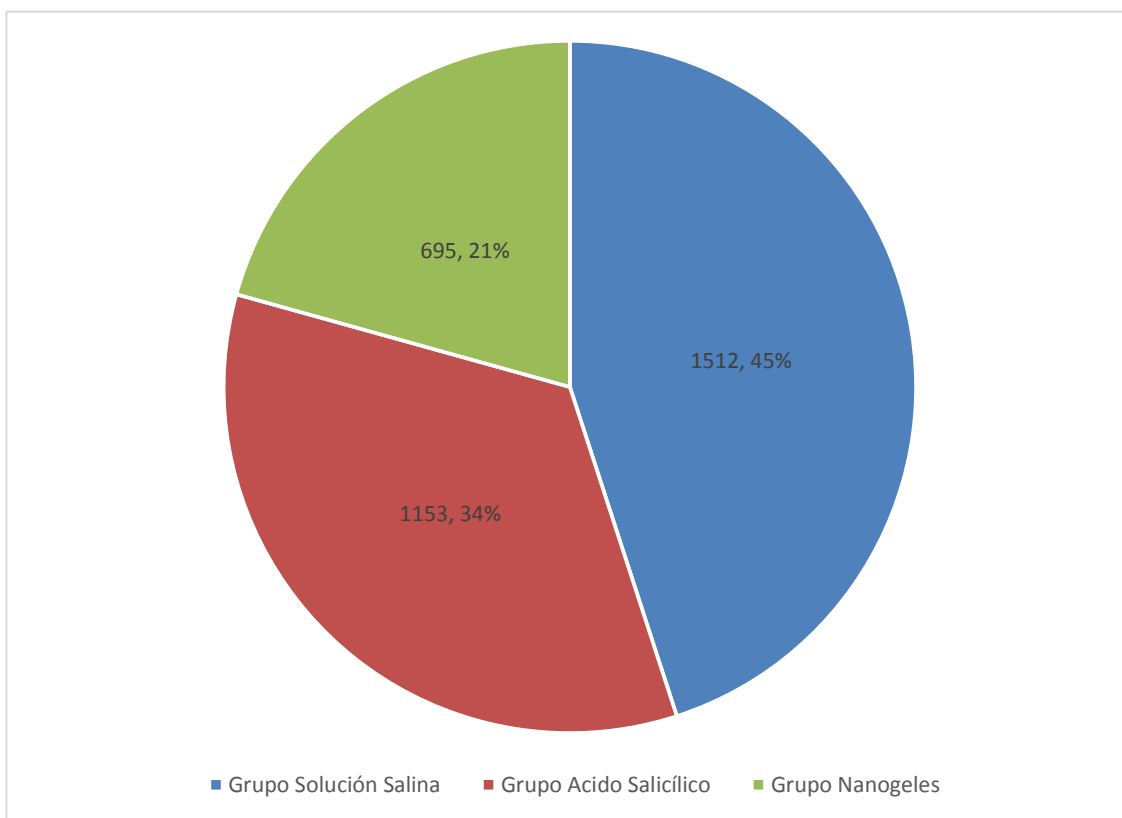
4.12 PROMEDIOS PRUEBA DE DOLOR CON FORMALINA 1% A LAS 48 HORAS

HORAS

En el presente grafico se muestran los promedios por cada grupo de trabajo en la prueba de dolor inducido con formalina y su efecto de liberación farmacológica a las 48 horas donde se aprecia en general en toda la prueba un claro incremento entre los dos controles tanto de ácido salicílico y solución salina fisiológica 0.9%, asimismo se logra establecer un punto donde hay un ligero declive del grupo solución salina.



4.13 DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA PRUEBA DE DOLOR INDUCIDO CON FORMALINA 1% n=24

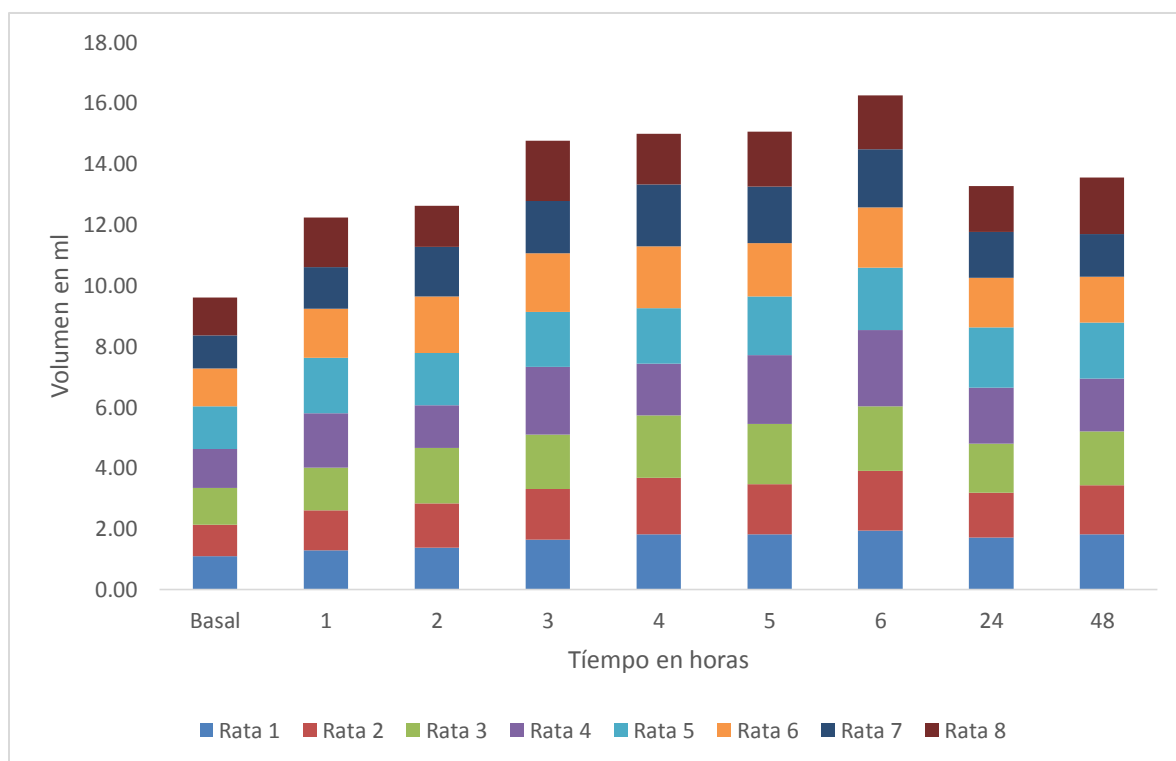


En la gráfica anterior se puede ver como la distribución de las contracciones traducidas como muestras de dolor en ratas se mantienen con un porcentaje del 45% en el grupo solución salina, con un número total de 1512 contracciones durante toda la prueba en los 8 animales estudiados, por consiguiente el grupo ácido salicílico mantiene un porcentaje del 34% con 1153 contracciones y finalmente el grupo de nanogeles PEGMA-MAOB con un 21% con 695 contracciones totales en los animales estudiados. Se puede ver un incremento en el número de contracciones en el estudio a las 24 horas en relación al grupo nanogeles.

4.14 PRUEBA DEL EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

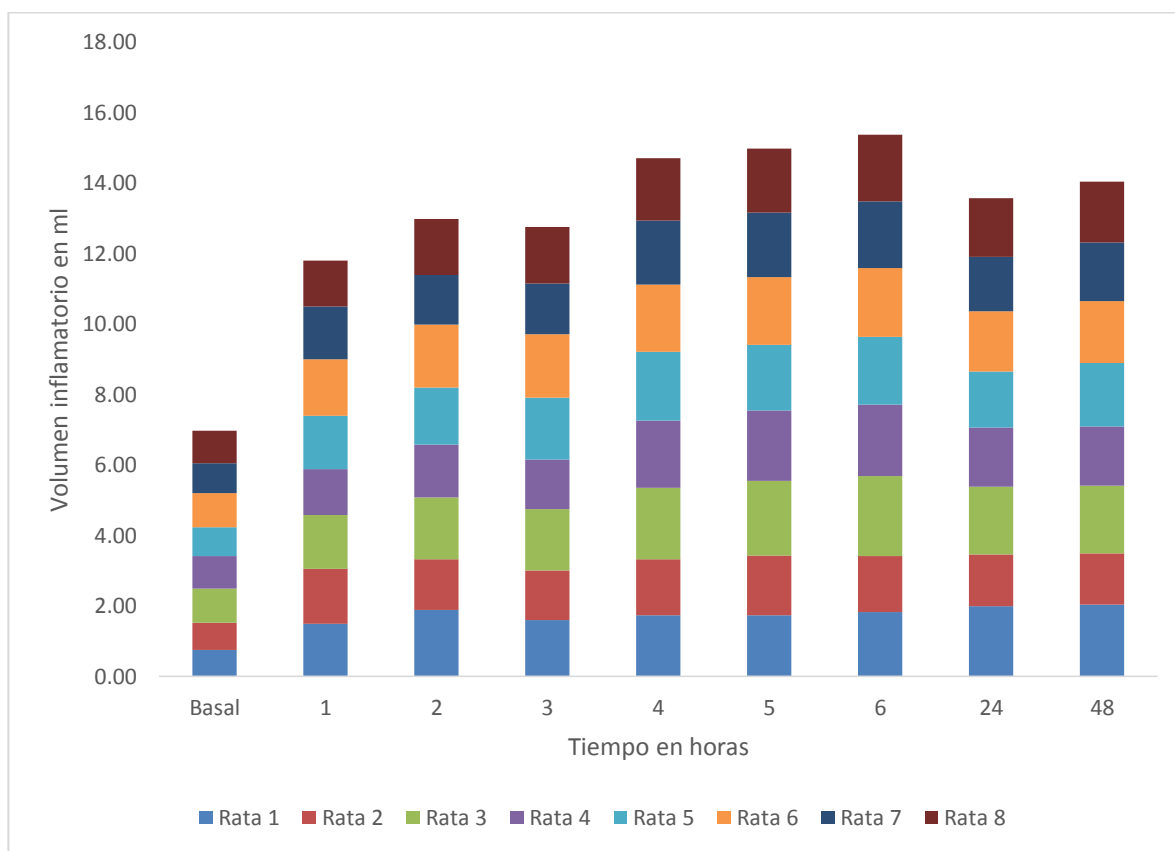
4.14.1 Grupo solución salina fisiológica 0.9%

La prueba de inflamación inducido con carragenina es una prueba ampliamente estudiada para evaluar el efecto de diversos medicamentos en fase de estudio y su posible efecto antiinflamatorio. En este estudio se trabajó con tres grupos; un control de solución salina fisiológica, control de ácido salicílico y los nanogeles PEGMA-MAOB 80/20 los animales se mantuvieron en observación durante 48 horas, tiempo en el cual se estuvo monitoreando su volumen inflamatorio en el pletismometro, obteniéndose que el volumen total de aumento durante toda la prueba en este grupo fue de 35.96 ml de los cuales el tiempo de mayor aumento inflamatorio se registra en la sexta hora de evaluación con el punto máximo de 6.65 ml de aumento inflamatorio en los 8 animales estudiados, en este tiempo se registra un promedio de 0.83 ml de aumento en cada animal estudiado, asimismo la rata que registra el menor volumen inflamatorio es la rata identificada con el número 5 con un volumen general de aumento durante toda la prueba de 3.75 ml



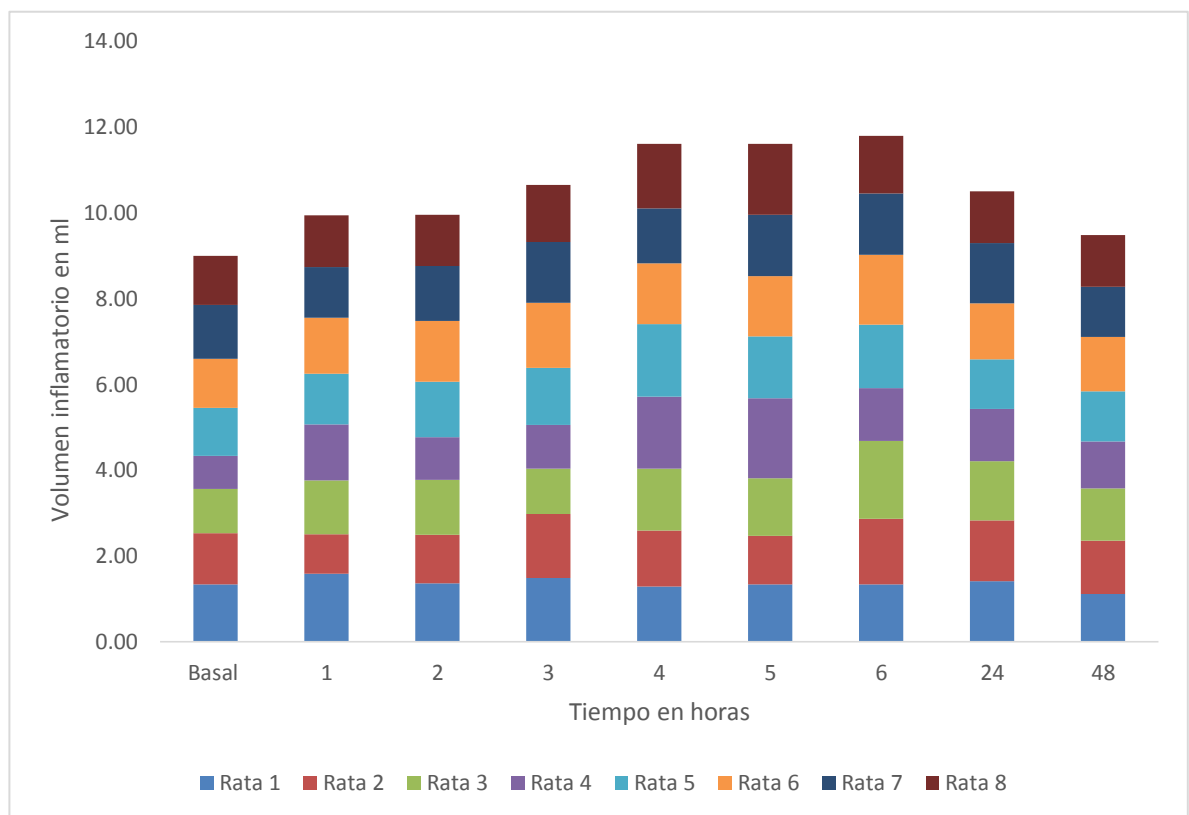
4.14.2 Grupo ácido salicílico 1 mg/ml

En el grupo administrado con ácido salicílico a cada animal se le aplicó una concentración de 1 mg/kg de peso de los animales, los cuales fueron aplicados y a las 24 horas de liberación farmacológica se realizó la prueba de inflamación con carragenina 1% donde se puede destacar un aumento de volumen inflamatorio total de 54.4 ml donde el tiempo que presenta el volumen inflamatorio más alto es nuevamente la sexta hora manifestando un volumen de 8.41 ml y un promedio de 1.92 ml de aumento de la pata inflamada en los 8 animales estudiados, la rata que responde con una menor inflamación es la rata número 2 con un volumen de aumento de 5.95 ml y un peso de 207 gramos.



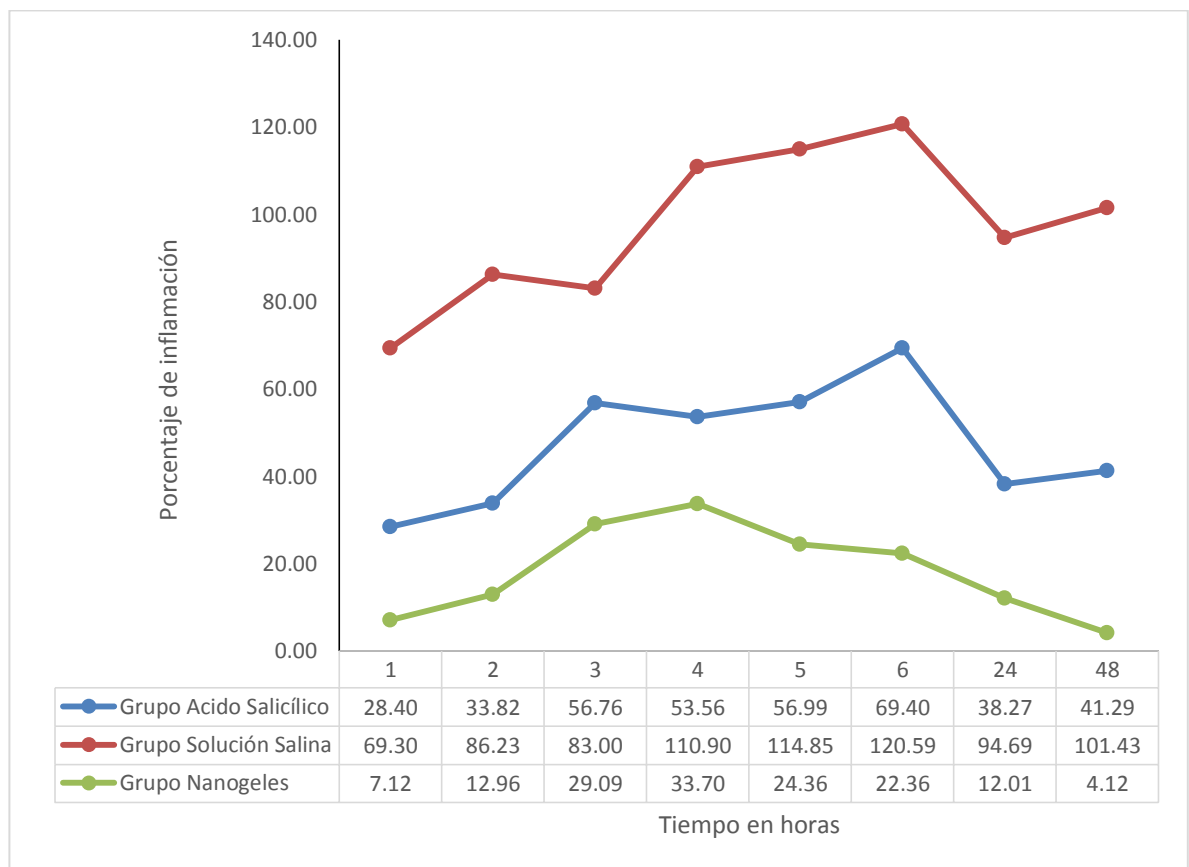
4.14.3 Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 80/20 1 mg/kg

En el grupo administrado con nanogeles cada animal recibió una inyección con una concentración de 1 mg/kg de nanogeles según peso de los animales, los cuales fueron aplicados y a las 24 horas de liberación farmacológica se realizó la prueba de inflamación con carragenina 1% donde cada animal recibió una inyección de 50 ul de carragenina se puede destacar un aumento de volumen inflamatorio total de 13.56 ml donde el tiempo que presenta el volumen inflamatorio más alto es nuevamente la sexta hora manifestando un volumen de 2.80 ml y un volumen promedio de 1.47 ml de aumento de la pata inflamada en los 8 animales estudiados, la rata que responde con una menor inflamación es la rata número 1 con un volumen de aumento de 0.18 ml y un peso de 225 gramos.

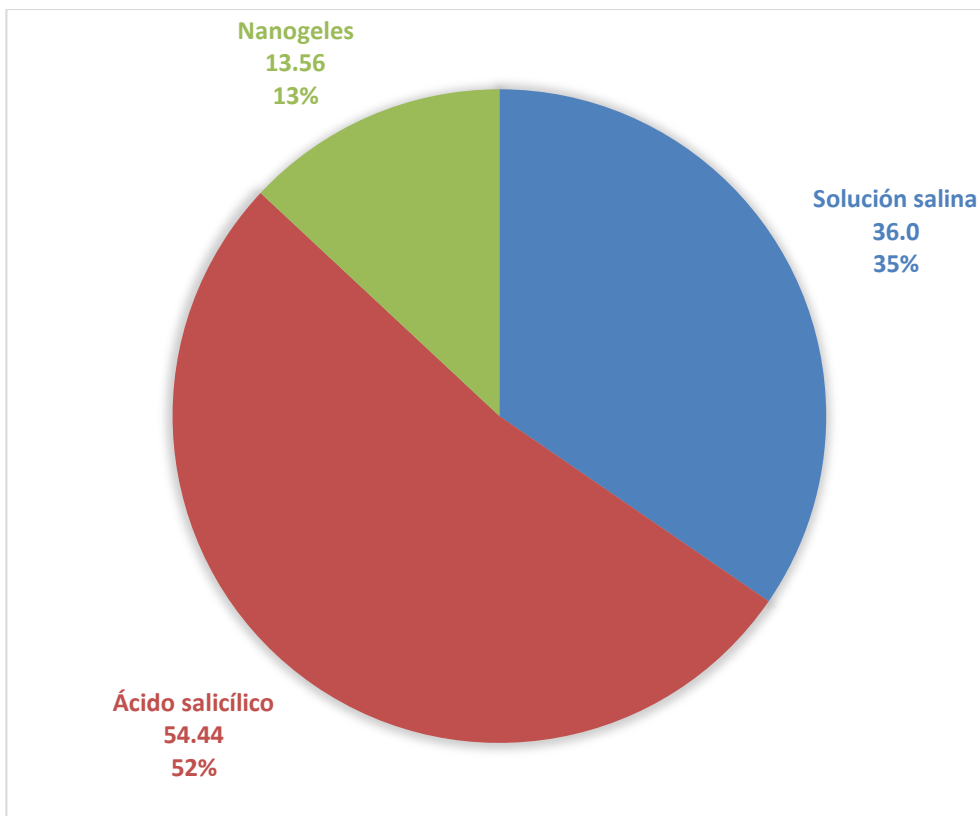


4.15 PROMEDIOS DEL PORCENTAJE INFLAMATORIO POR TIEMPOS.

Finalmente se puede ver el porcentaje de inflamación de los diferentes grupos estudiados, en los tres grupos se alcanza el punto más alto de inflamación en la sexta hora del estudio, aquí destaca el aumento de la pata en estudio del grupo solución salina ya que aumento en un 120.59% es decir, más del doble en comparación con la pata basal de su mismo grupo, con un 69.40% y un 31.09% en los grupos ácido salicílico y nanogeles respectivamente, posterior a esto se puede ver cómo es que disminuye el efecto inflamatorio en las 24 y 48 horas.



4.16 DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL VOLUMEN INFLAMATORIO

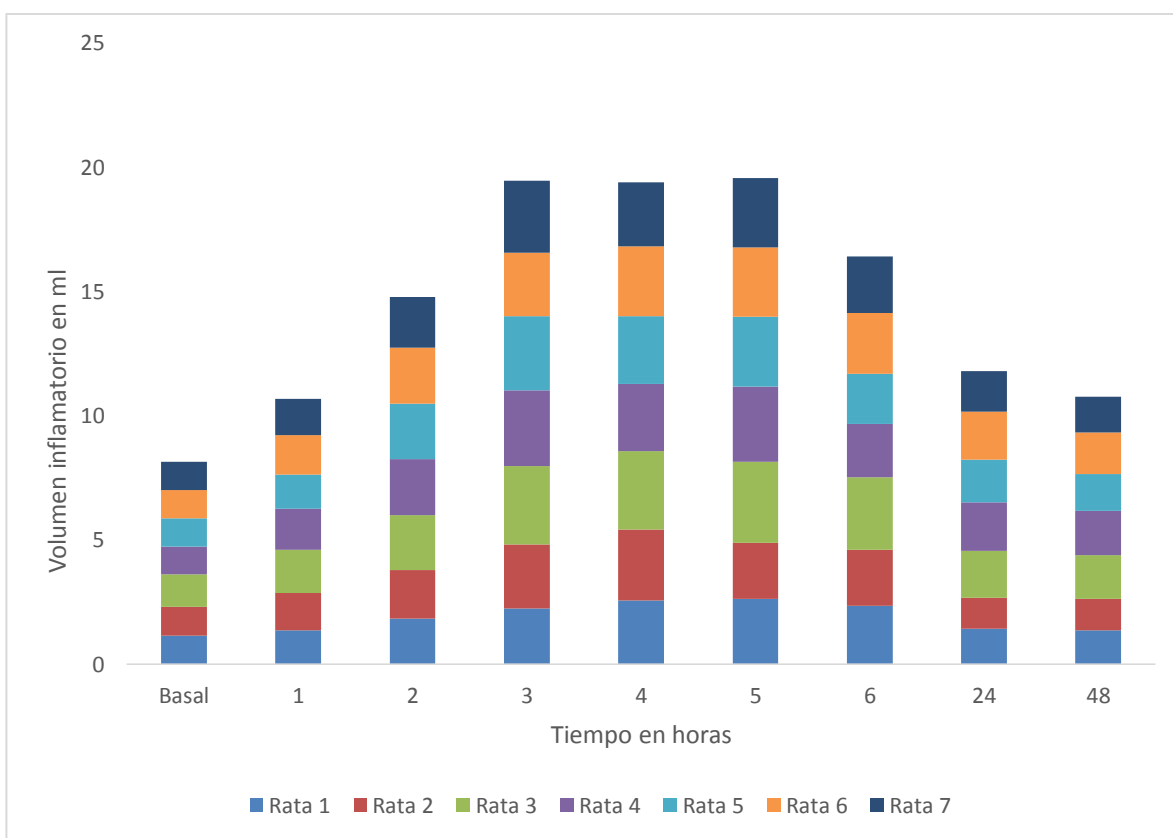


La grafica anterior representa el volumen de aumento total de cada grupo en la prueba del edema inducido con carragenina 1% donde se puede destacar el aumento del grupo solución salina con 52% que representa la mayor cantidad del volumen inflamatorio total de la prueba, seguido del ácido salicílico con 35% con 36 ml de aumento de volumen y finalmente el grupo nanogels con un 13% y un volumen final de 13.56 ml

4.17 PRUEBA DEL EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1% EN CONCENTRACION 0.50 Y 0.30%

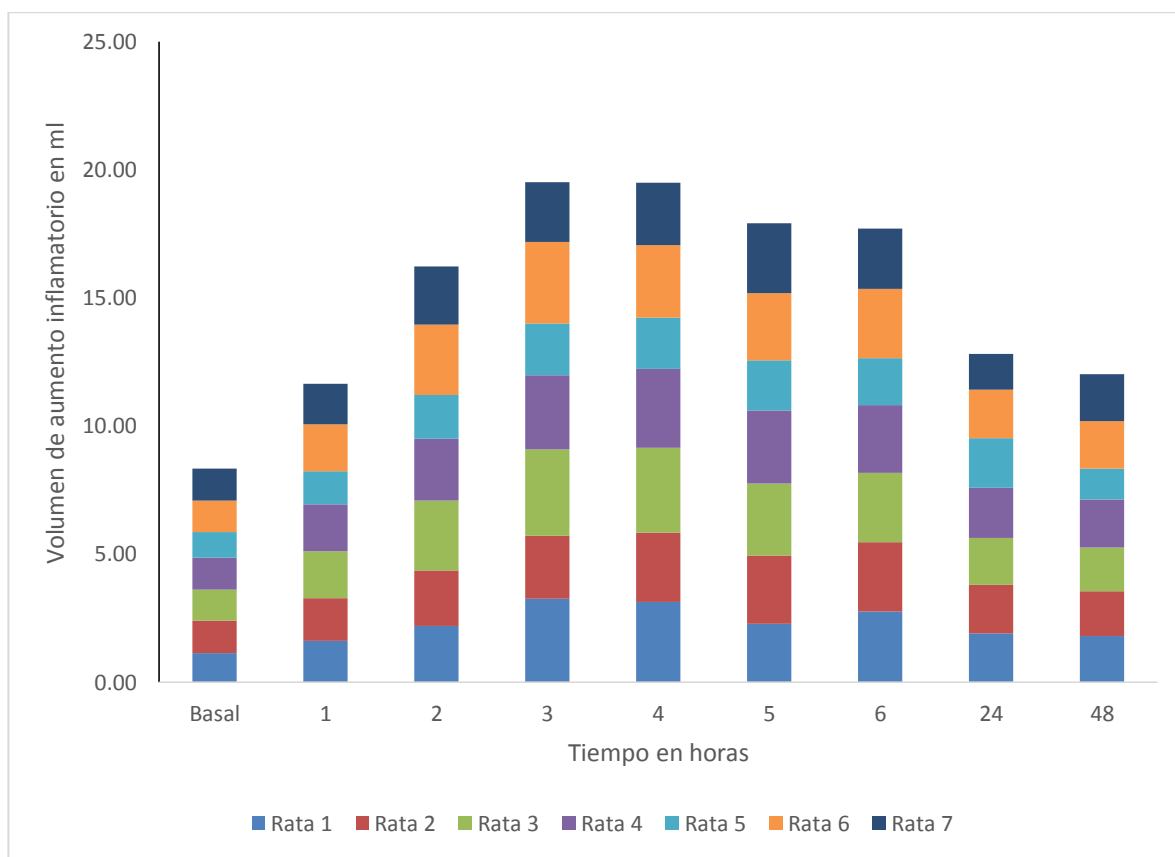
4.17.1 Grupo Solución Salina:

Para evaluar la concentración mínima que presenta un efecto antiinflamatorio se bajaron las dosis de los fármacos de referencia al 50 y 30 % se diseñó el experimento y se evaluaron dos grupos de tratamientos y sus respectivos controles de prueba, se evaluó nuevamente el efecto del grupo control de solución salina. Aquí se puede ver como en el tiempo 3, 4, y 5 se alcanza el volumen de aumento máximo, particularmente en la hora 5 con un volumen de aumento de 11.44 ml



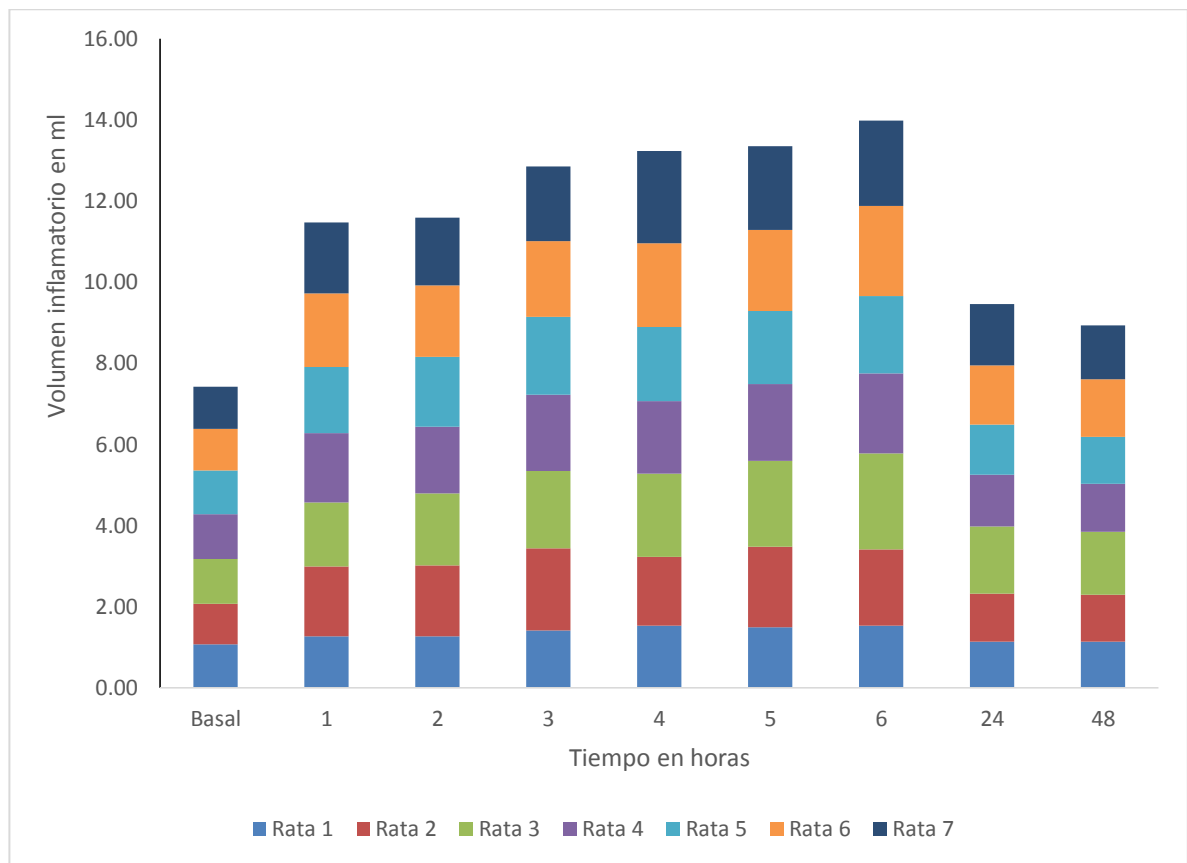
4.17.2 Grupo Ácido Salicílico

Las ratas administradas con ácido salicílico recibieron una inyección intravenosa de 1 mg/kg de peso, a las 24 horas de administrada se evaluó el efecto antiinflamatorio induciendo edema con carragenina 1% obteniéndose que el mayor volumen de aumento inflamatorio se produce en la tercera hora de estudio con un volumen 11.18 ml la rata que produce el menor volumen inflamatorio es la rata 5 con 6.04 ml de aumento durante toda la prueba y la que registra el mayor volumen es la rata 3 con 10.70 ml de volumen inflamatorio.



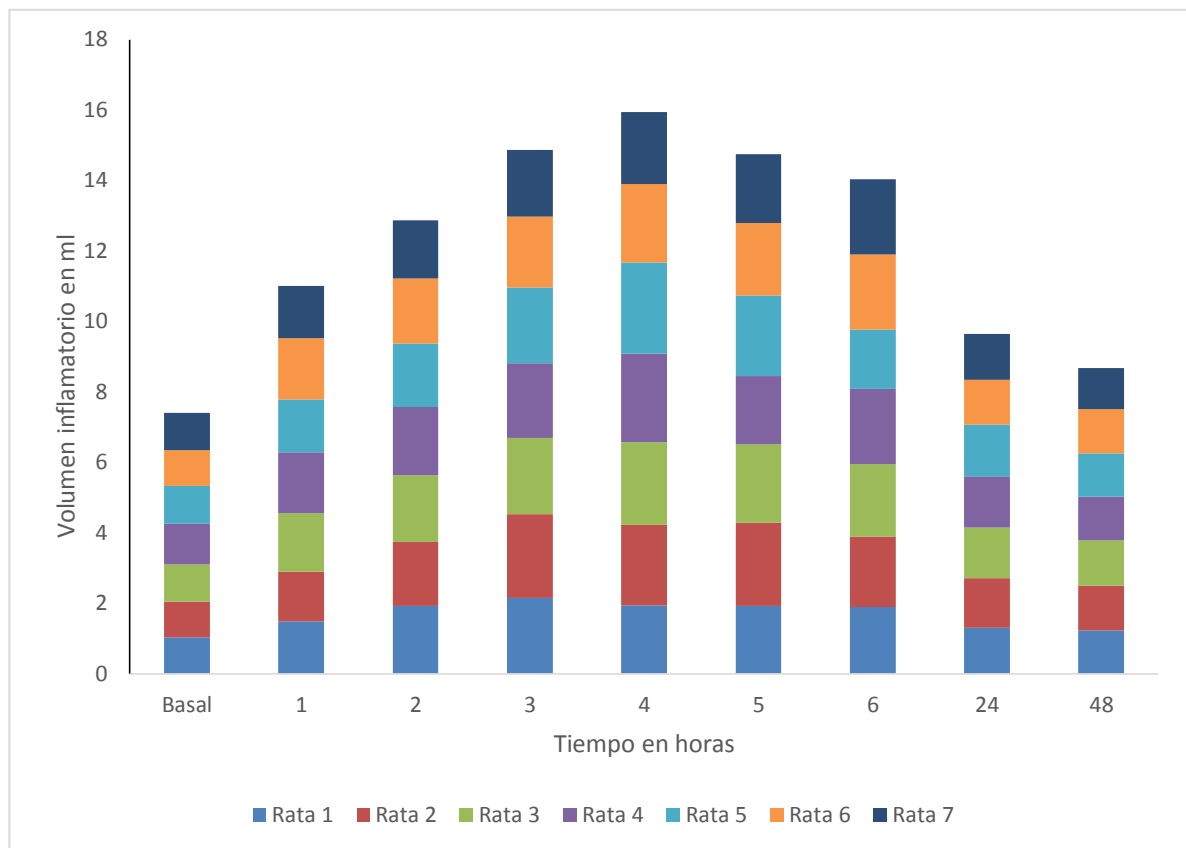
4.17.3 Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 50%

El grupo de nanogeles PEGMA-MAOB fue tratado con una inyección de solución de nanogeles al 50% aplicados vía intravenosa el volumen de 1 mg/kg de peso en la ratas las cuales a las 24 horas de administrada se evaluó el efecto antiinflamatorio induciendo edema con carragenina 1% obteniéndose que el mayor volumen de aumento inflamatorio se produce en la sexta hora de estudio con un volumen 6.55 ml. Asimismo, la rata que produce el menor volumen inflamatorio es la rata 1 con 2.19 ml de aumento durante toda la prueba y la que registra el mayor volumen es la rata 6 con 6.36 ml de volumen inflamatorio.

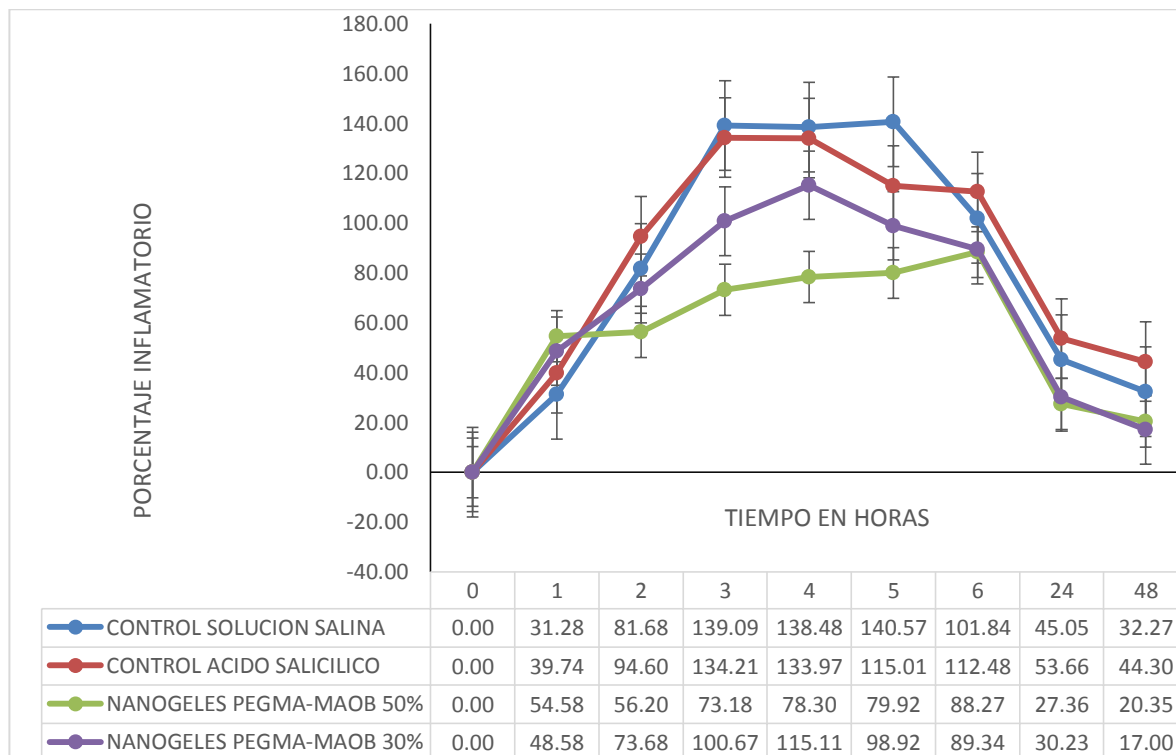


4.17.4 Grupo Nanogeles PEGMA-MAOB 30%

El grupo de nanogeles PEGMA-MAOB fue tratado con una inyección de solución de nanogeles al 30% aplicados vía intravenosa el volumen de 1 mg/kg de peso en la ratas, las cuales a las 24 horas de administrada se evaluó el efecto antiinflamatorio induciendo edema con carragenina 1% obteniéndose un volumen de aumento general en toda la prueba de 42.5 ml de los cuales el mayor volumen de aumento inflamatorio se produce en la cuarta hora de estudio con un volumen 8.53 ml. Asimismo, la rata que produce el menor volumen inflamatorio es la rata 7 con 5.12 ml de aumento durante toda la prueba y la que registra el mayor volumen es la rata 2 con 6.80 ml de volumen inflamatorio, los resultados se pueden ver en la siguiente gráfica.

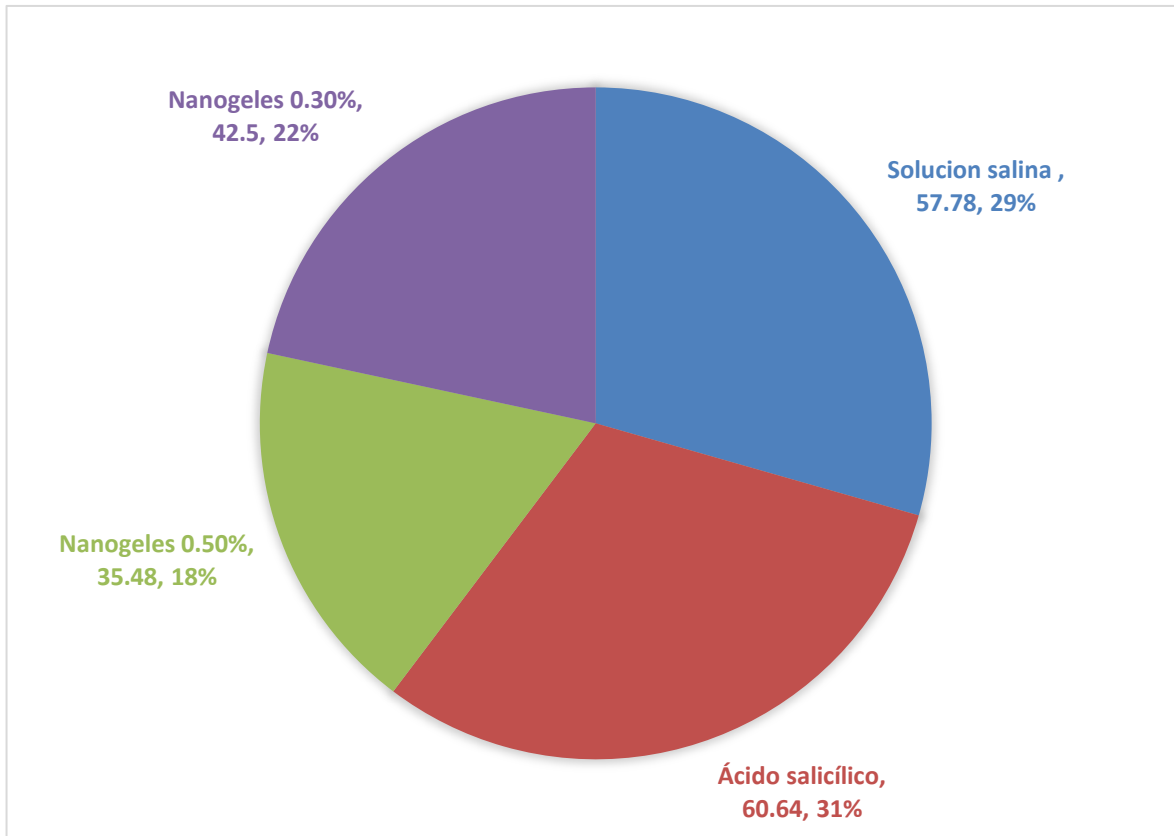


4.18 PORCENTAJE INFLAMATORIO DEL EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%



En la anterior grafica se encuentran los datos de los porcentajes de las medias de cada grupo de animales estudiados y cada tiempo de muestra en los cuales se puede ver el aumento significativo en el tiempo 5 en el grupo solución salina con un 140.57%, el porcentaje menor se encuentra en el grupo nanogeles al 30% con un porcentaje del 17.0% seguido de nanogeles a la concentración de 50% con un 25.35%, sin embargo, estas dos últimas lecturas tanto a las 24 y 48 horas el efecto de la carragenina se encuentra fisiológicamente disminuido debido a que su mayor efecto se encuentra entre las 3 y 5 horas de administrado.

4.19 DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL VOLUMEN INFLAMATORIO



En esta grafica se pueden ver los valores de las medias de los cuatro grupos de prueba y el porcentaje correspondiente a cada grupo, aquí se puede ver como el grupo ácido salicílico se mantiene por encima del resto de los grupos con un valor de 31%, asimismo, se puede ver como el grupo de los tratamientos de nanogeles al 50% ocupan el menor porcentaje en la gráfica con un valor de 18%.

4.20 EVALUACION HISTOPATOLOGICA

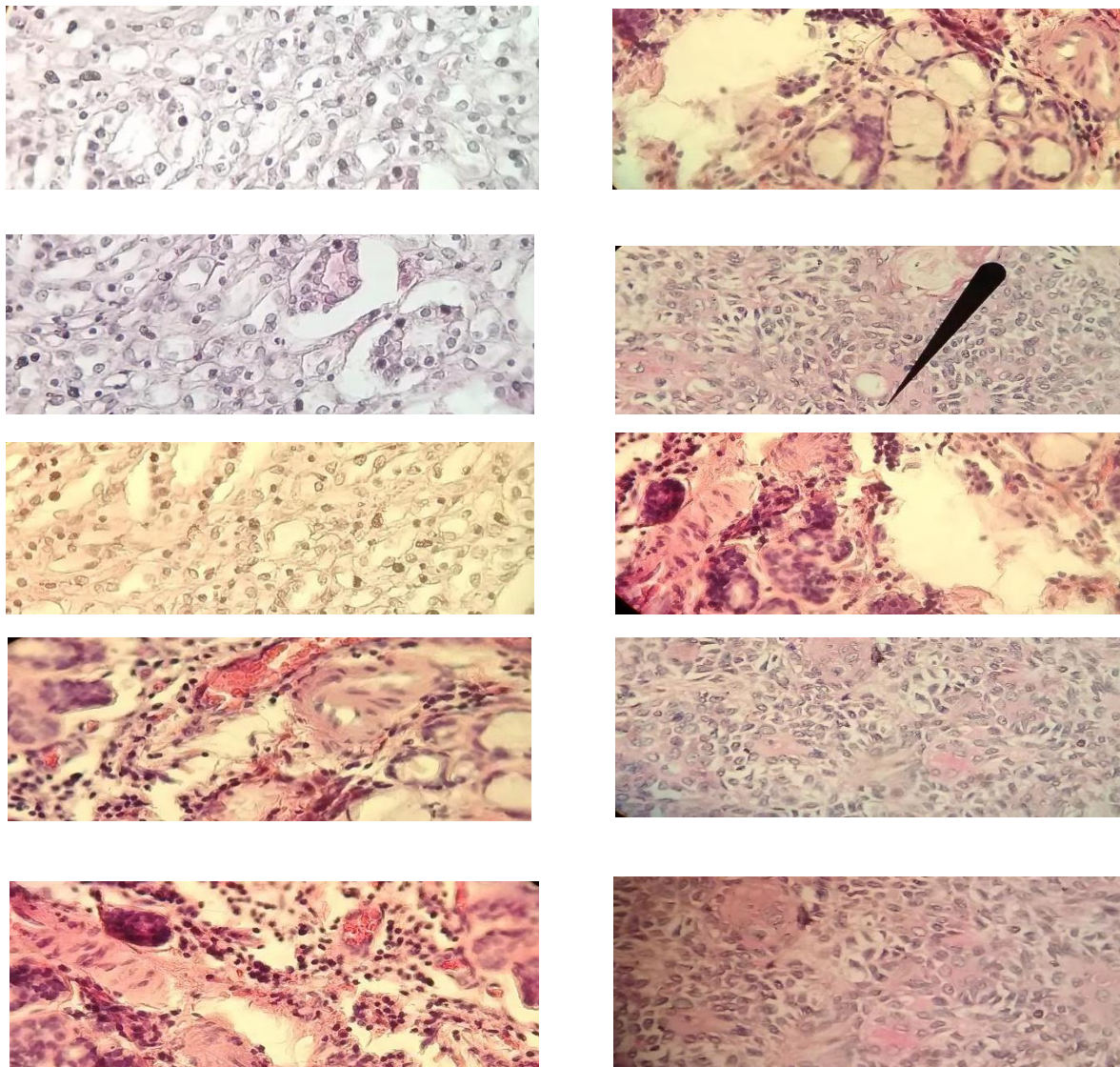


Ilustración 12. Evaluación histopatológica

CAPITULO V
CONCLUSIONES

En el presente proyecto se logró evaluar las propiedades de los nanogeles PEGMA / MAOB, se desarrolló un trabajo experimental para determinar el efecto antiinflamatorio y antiedematogenico de los nanogeles frente a ratas wistar, se les aplicó dolor y se contrarrestó el efecto nociceptivo mediante los nanogeles estabilizados con PEGMA/MAOB, de igual forma se estimuló un proceso inflamatorio para determinar el efecto del nanogel frente a la respuesta inflamatoria de los animales, para la realización de estos estudios se utilizaron 100 ratas wistar las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de alimentación y temperatura.

El estudio se llevó a cabo frente a controles de solución salina fisiológica y ácido salicílico y se pudo determinar que en las pruebas de dolor los animales que mayor efecto tuvieron al dolor fueron los que se trataron con solución salina fisiológica, seguidos de los que se trataron con ácido salicílico y posteriormente los tratados con la solución de nanogeles PEGMA/MAOB.

Asimismo se evaluó el efecto antiinflamatorio y los resultados fueron muy similares, llegando a la conclusión de que los nanogeles PEGMA/MAOB tienen mayor efecto antiinflamatorio que los controles de solución salina fisiológica y ácido salicílico, en esta prueba se comprobó la efectividad de los nanogeles cuantificando el volumen inflamatorio de la extremidad tratada y conociendo el volumen de aumento de dicha extremidad comparada con la extremidad basal, la cual no recibió ningún tratamiento.

En conclusión los nanogeles PEGMA/MAOB 80/20 demuestran mayor efecto antiinflamatorio y antinociceptivo que los controles de solución salina fisiológica y ácido salicílico en ratas wistar.

TABLAS DE DATOS PRUEBA DE FORMALINA 1% A LAS 24 HORAS

Tiempo (min)	No. de sacudidas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Promedio	Desvest
0	36	45	25	14	23	22	25	24	26.8	9.5
5	15	14	15	10	14	11	13	8	12.5	2.6
10	7	7	4	4	0	1	7	6	4.5	2.8
15	23	21	8	2	2	6	10	8	10.0	7.9
20	18	8	23	23	1	1	6	22	12.8	9.8
25	6	7	19	5	13	18	10	17	11.9	5.7
30	15	6	23	9	9	22	11	17	14.0	6.3
35	21	13	17	13	7	11	5	10	12.1	5.2
40	21	7	16	18	12	18	6	10	13.5	5.6
45	8	6	14	18	6	11	7	7	9.6	4.4
50	8	9	11	14	7	7	8	10	9.3	2.4
55	15	11	25	10	2	2	5	19	11.1	8.2
60	14	5	5	22	5	3	6	18	9.8	7.2
Peso (gr)	180.0	195.0	181.0	214.0	207.0	195.5	210.0	191.0		

Tabla 5. Prueba de dolor grupo solución salina

Tiempo (min)	No. de sacudidas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Prome dio	Desvest
0	20	16	21	10	10	17	12	14	15.4	5.3
5	9	10	8	6	6	10	9	10	7.8	1.8
10	0	7	1	0	0	4	7	8	1.6	3.0
15	5	2	6	0	0	3	6	9	2.6	2.8
20	13	11	6	7	7	5	5	12	8.8	3.0
25	9	10	9	2	2	7	4	10	6.4	4.0
30	10	16	3	7	7	6	12	8	8.6	4.8
35	4	7	4	11	11	5	8	9	7.4	3.5
40	7	8	5	2	2	3	7	7	4.8	2.8
45	10	10	8	3	3	4	6	5	6.8	3.6
50	11	12	3	0	0	6	6	0	5.2	5.9
55	14	8	4	6	6	9	4	3	7.6	3.8
60	3	8	3	5	5	7	5	2	4.8	2.0
Peso (g)	205.0	185.0	242.0	220.0	210.0	202.0	195.0	209.0		

Tabla 6. Prueba de dolor grupo ácido salicílico

Tiempo (min)	No. de sacudidas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Promedio	Desvest
0	7	10	2	3	0	8	3	0	4.1	3.8
5	3	4	9	0	0	3	2	3	3.0	2.8
10	1	0	0	2	2	0	6	2	1.6	2.0
15	0	0	4	1	0	0	0	0	0.6	1.4
20	3	0	3	2	0	2	7	5	2.8	2.4
25	0	0	8	0	0	11	0	3	2.8	4.4
30	2	2	2	2	2	8	1	5	3.0	2.3
35	0	0	0	0	0	0	5	5	1.3	2.3
40	4	2	3	0	0	5	2	8	3.0	2.7
45	9	2	2	2	1	10	12	10	6.0	4.6
50	2	2	4	0	5	6	4	3	3.3	1.9
55	4	2	0	5	2	4	2	8	3.4	2.4
60	3	0	0	2	1	5	5	4	2.5	2.1
Peso (g)	220.0	222.0	220.0	220.0	210.0	217.0	182.5	230.0		

Tabla 7. Prueba de dolor grupo Nanogeles PEGMA/MAOB

TABLAS DE DATOS PRUEBA DE FORMALINA 1% A LAS 48 HORAS

Tiempo (min)	No. de sacudidas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Promedio	Desvest
0	25	14	28	27	31	10	13	24	7.4	6.1
5	23	17	4	24	10	12	13	12	4.0	4.3
10	18	10	5	22	9	16	23	2	4.5	2.7
15	10	12	2	16	1	22	25	18	7.3	6.0
20	23	11	4	9	15	20	18	13	4.8	3.7
25	9	12	7	15	14	22	21	19	8.3	3.5
30	11	13	17	13	11	19	19	15	8.0	3.8
35	13	14	7	20	5	25	20	12	6.0	3.3
40	10	30	0	29	12	27	26	0	10.4	1.8
45	17	27	1	33	6	15	15	14	6.5	3.6
50	9	20	2	15	6	21	21	6	7.9	4.7
55	10	18	9	17	3	20	14	4	7.6	3.0
60	2	16	4	20	8	16	24	1	4.4	5.0
Peso (g)	226.0	234.0	261.0	226.0	225.5	175.5	161.5	172.0		

Tabla 8. Prueba de dolor grupo solución salina 48 horas

Tiempo (min)	No. de sacudidas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Promedio	Desvest
0	12	15	33	12	13	5	9	24	15.4	9.0
5	16	8	13	10	10	10	15	8	11.3	3.1
10	27	12	5	13	5	8	8	5	10.4	7.4
15	24	11	1	10	8	13	9	13	11.1	6.4
20	20	7	9	9	7	11	7	4	9.3	4.8
25	12	6	11	16	0	13	11	2	8.9	5.6
30	16	8	8	12	3	12	20	20	12.4	6.0
35	16	9	2	13	6	15	19	10	11.3	5.6
40	15	14	6	11	4	14	17	11	11.5	4.5
45	13	12	5	18	7	16	20	3	11.8	6.2
50	12	9	2	19	6	13	20	6	10.9	6.4
55	10	13	1	12	7	14	21	4	10.3	6.3
60	7	10	6	16	4	12	19	5	9.9	5.4
Peso (g)	146.0	171.5	167.0	164.0	161.0	195.5	174.0	167.0		

Tabla 9. Prueba de dolor grupo ácido salicílico 48 horas

Tiempo (min)	No. de sacudidas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Promedio	Desvest
0	7	8	16	5	17	3	1	2	7.4	6.1
5	2	6	12	0	8	3	0	1	4.0	4.3
10	3	5	6	6	9	4	0	3	4.5	2.7
15	0	10	17	8	13	7	2	1	7.3	6.0
20	3	9	5	0	6	10	5	0	4.8	3.7
25	11	7	4	12	10	7	12	3	8.3	3.5
30	7	4	12	4	13	5	7	12	8.0	3.8
35	5	6	3	6	7	6	13	2	6.0	3.3
40	13	12	9	9	8	12	11	9	10.4	1.8
45	6	15	6	7	5	5	5	3	6.5	3.6
50	5	13	7	16	10	4	5	3	7.9	4.7
55	9	9	8	11	2	4	9	9	7.6	3.0
60	0	7	10	13	2	3	0	0	4.4	5.0
Peso (g)	164.0	150.0	180.0	162.0	156.0	194.5	159.0	170.0		

Tabla 10. Prueba de dolor grupo nanogeles PEGMA/MAOB

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Rata	Tiempo (h)								
	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	1.09	1.29	1.37	1.64	1.81	1.8	1.94	1.71	1.81
2	1.03	1.31	1.47	1.66	1.87	1.65	1.95	1.46	1.61
3	1.22	1.40	1.82	1.78	2.05	1.99	2.13	1.62	1.78
4	1.28	1.79	1.41	2.23	1.69	2.26	2.51	1.84	1.73
5	1.40	1.83	1.72	1.80	1.83	1.92	2.04	1.98	1.85
6	1.24	1.63	1.86	1.92	2.03	1.75	1.99	1.63	1.51
7	1.10	1.36	1.64	1.72	2.04	1.86	1.91	1.51	1.39
8	1.23	1.63	1.35	1.98	1.67	1.81	1.76	1.51	1.87
Promedio	1.20	1.53	1.58	1.84	1.87	1.88	2.03	1.66	1.69

Tabla 11. Prueba de inflamación grupo solución salina

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (h)								
	1	2	3	4	5	6	24	48
1	7.61	13.87	50.57	36.81	50.16	61.84	42.65	50.99
2	9.28	22.21	56.00	38.89	38.06	62.67	21.79	34.31
3	16.37	51.41	71.01	48.49	66.01	77.69	35.14	48.49
4	49.32	17.21	40.98	86.44	88.53	109.80	53.49	44.32
5	52.24	43.48	52.66	50.57	60.17	70.18	65.17	54.33
6	35.56	54.74	69.34	60.17	46.40	66.42	35.97	25.96
7	13.45	36.39	70.18	43.90	55.16	59.33	25.96	15.95
8	35.56	12.62	39.31	65.59	51.41	47.24	25.96	56.00
Promedio	28.40	33.82	56.76	53.56	56.99	69.40	38.27	41.29

Tabla 12. Porcentaje inflamatorio grupo solución salina

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (h)									
	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	0.75	1.49	1.89	1.60	1.73	1.735	1.83	1.99	2.04
2	0.78	1.56	1.43	1.41	1.59	1.7	1.58	1.47	1.45
3	0.97	1.53	1.76	1.74	2.03	2.12	2.27	1.92	1.93
4	0.91	1.31	1.50	1.40	1.91	1.99	2.04	1.69	1.67
5	0.82	1.52	1.61	1.76	1.96	1.855	1.92	1.58	1.8
6	0.97	1.60	1.79	1.80	1.9	1.93	1.94	1.71	1.76
7	0.85	1.50	1.41	1.43	1.83	1.82	1.89	1.55	1.66
8	0.92	1.30	1.59	1.615	1.77	1.815	1.9	1.66	1.73
Promedio	0.87	1.48	1.62	1.59	1.84	1.87	1.92	1.70	1.76

Tabla 13. Prueba de inflamación grupo ácido salicílico

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (horas)									
Rata	1	2	3	4	5	6	24	48	
1	71.02	116.93	83.64	98.57	99.14	110.04	128.41	134.15	
2	79.05	64.13	61.84	82.50	95.12	81.35	68.72	66.43	
3	75.61	102.01	99.71	133.00	143.33	160.55	120.37	121.52	
4	49.78	72.17	60.69	118.65	128.98	134.15	93.97	91.68	
5	73.89	84.79	101.43	124.96	112.91	120.37	81.35	106.60	
6	83.07	105.45	106.60	117.50	121.52	122.67	96.27	102.01	
7	72.74	61.84	64.71	109.47	109.47	117.50	77.91	90.53	
8	49.21	82.50	85.37	102.58	108.32	118.08	90.53	98.57	
Promedio	69.30	86.23	83.00	110.90	114.85	120.59	94.69	101.43	

Tabla 14. Porcentaje inflamatorio grupo ácido salicílico

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

	Tiempo (horas)								
	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	1.12	1.20	1.36	1.48	1.29	1.33	1.33	1.41	1.11
2	1.07	1.13	1.13	1.50	1.53	1.3	1.41	1.24	1.13
3	1.03	1.26	1.29	1.36	1.45	1.39	1.34	1.34	1.21
4	1.31	1.17	1.21	1.67	1.87	1.23	1.03	1	1.09
5	1.12	1.18	1.29	1.32	1.69	1.44	1.48	1.16	1.17
6	1.14	1.32	1.42	1.53	1.42	1.39	1.63	1.31	1.27
7	1.06	1.175	1.275	1.41	1.28	1.43	1.43	1.4	1.17
8	1.14	1.205	1.19	1.34	1.5	1.66	1.33	1.2	1.2
Promedio	1.12	1.20	1.27	1.45	1.50	1.40	1.38	1.26	1.17

Tabla 15. Prueba de inflamación grupo Nanogeles PEGMA/MAOB

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Rata	Tiempo (horas)							
	1	2	3	4	5	6	24	48
1	6.79	20.58	31.70	14.79	18.35	18.80	25.47	-0.78
2	0.56	0.56	33.04	36.15	15.68	25.47	10.34	10.34
3	11.68	14.35	21.02	28.59	19.69	19.24	19.24	8.12
4	4.12	7.68	49.05	49.05	66.41	9.45	-11.01	-3.00
5	5.01	14.79	17.46	50.39	28.59	31.70	3.23	4.12
6	17.02	26.36	35.71	26.36	24.14	45.49	16.57	13.01
7	4.56	13.46	25.47	13.46	27.25	27.25	24.58	4.12
8	7.23	5.90	19.24	33.48	47.72	18.80	6.79	6.79
Promedio	7.12	12.96	29.09	31.54	30.98	24.53	11.90	5.34

Tabla 16. Porcentaje inflamatorio grupo nanogeles PEGMA/MAOB

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (h)									
Rata	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	1.14	1.35	1.84	2.24	2.56	2.63	2.35	1.43	1.36
2	1.17	1.52	1.94	2.58	2.86	2.26	2.25	1.23	1.26
3	1.31	1.74	2.21	3.15	3.16	3.26	2.92	1.9	1.77
4	1.11	1.64	2.27	3.05	2.71	3.02	2.16	1.96	1.79
5	1.14	1.39	2.23	2.99	2.72	2.81	2	1.72	1.47
6	1.13	1.58	2.25	2.55	2.82	2.8	2.45	1.93	1.67
7	1.13	1.46	2.04	2.89	2.57	2.79	2.29	1.63	1.44
Promedio	1.16	1.53	2.11	2.78	2.77	2.80	2.35	1.69	1.54

Tabla 17. Prueba de inflamación grupo solución salina

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (horas)								
Rata	1	2	3	4	5	6	24	48
1	16.16	58.33	92.75	120.28	126.31	102.21	23.05	17.03
2	30.79	66.93	122.00	146.10	94.47	93.61	5.84	8.42
3	49.72	90.17	171.05	171.91	180.52	151.26	63.49	52.30
4	41.12	95.33	162.45	133.19	159.86	85.86	68.65	54.03
5	19.61	91.89	157.28	134.05	141.79	72.10	48.00	26.49
6	35.96	93.61	119.42	142.66	140.93	110.82	66.07	43.70
7	25.63	75.54	148.68	121.14	140.07	97.05	40.26	23.91
Promedio	31.28	81.68	139.09	138.48	140.57	101.84	45.05	32.27

Tabla 18. Porcentaje inflamatorio grupo solución salina

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (h)									
Rata	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	1.14	1.62	2.20	3.26	3.14	2.28	2.76	1.9	1.8
2	1.27	1.66	2.16	2.46	2.7	2.66	2.7	1.9	1.74
3	1.20	1.84	2.72	3.37	3.31	2.82	2.7	1.82	1.72
4	1.26	1.83	2.41	2.88	3.08	2.84	2.65	1.96	1.86
5	0.99	1.28	1.71	2.02	1.99	1.96	1.84	1.94	1.22
6	1.23	1.83	2.76	3.19	2.83	2.62	2.69	1.89	1.84
7	1.24	1.58	2.25	2.33	2.44	2.73	2.36	1.39	1.84
Promedio	1.19	1.66	2.32	2.79	2.78	2.56	2.53	1.83	1.72

Tabla 19. Prueba de inflamación grupo ácido salicílico

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Tiempo (horas)								
Rata	1	2	3	4	5	6	24	48
1	36.13	84.87	173.95	163.87	91.60	131.93	59.66	51.26
2	39.50	81.51	106.72	126.89	123.53	126.89	59.66	46.22
3	54.62	128.57	183.19	178.15	136.97	126.89	52.94	44.54
4	53.78	102.52	142.02	158.82	138.66	122.69	64.71	56.30
5	7.56	43.70	69.75	67.23	64.71	54.62	63.03	2.52
6	53.78	131.93	168.07	137.82	120.17	126.05	58.82	54.62
7	32.77	89.08	95.80	105.04	129.41	98.32	16.81	54.62
Promedio	39.74	94.60	134.21	133.97	115.01	112.48	53.66	44.30

Tabla 20. Porcentaje inflamatorio grupo ácido salicílico

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Rata	Tiempo (horas)								
	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	1.07	1.26	1.26	1.41	1.53	1.49	1.53	1.14	1.13
2	1.00	1.73	1.75	2.03	1.69	1.99	1.88	1.18	1.16
3	1.10	1.57	1.78	1.90	2.05	2.11	2.36	1.65	1.55
4	1.11	1.72	1.64	1.88	1.79	1.89	1.97	1.28	1.19
5	1.07	1.62	1.72	1.92	1.83	1.8	1.91	1.24	1.15
6	1.03	1.82	1.77	1.86	2.06	2	2.22	1.45	1.42
7	1.04	1.75	1.67	1.85	2.28	2.07	2.1	1.51	1.33
Promedio	1.06	1.64	1.66	1.84	1.89	1.91	2.00	1.35	1.28

Tabla 21. Prueba de inflamación grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 50%

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Rata	Tiempo (horas)							
	1	2	3	4	5	6	24	48
1	18.87	18.87	33.02	44.34	40.57	44.34	7.55	6.60
2	63.21	65.09	91.51	59.43	87.74	77.36	11.32	9.43
3	48.11	67.92	79.25	93.40	99.06	122.64	55.66	46.23
4	62.26	54.72	77.36	68.87	78.30	85.85	20.75	12.26
5	52.83	62.26	81.13	72.64	69.81	80.19	16.98	8.49
6	71.70	66.98	75.47	94.34	88.68	109.43	36.79	33.96
7	65.09	57.55	74.53	115.09	95.28	98.11	42.45	25.47
Promedio	54.58	56.20	73.18	78.30	79.92	88.27	27.36	20.35

Tabla 22. Porcentaje inflamatorio grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 50%

VOLUMEN INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Rata	Tiempo (horas)								
	Basal	1	2	3	4	5	6	24	48
1	1.03	1.49	1.92	2.15	1.94	1.93	1.89	1.3	1.23
2	1.02	1.41	1.82	2.38	2.29	2.36	2.01	1.42	1.27
3	1.06	1.66	1.9	2.17	2.35	2.22	2.06	1.43	1.29
4	1.15	1.73	1.93	2.11	2.51	1.94	2.13	1.46	1.24
5	1.07	1.49	1.8	2.15	2.58	2.29	1.67	1.46	1.23
6	1.02	1.75	1.85	2.02	2.23	2.06	2.14	1.27	1.25
7	1.06	1.48	1.65	1.89	2.04	1.94	2.13	1.31	1.16
Promedio	1.0586	1.573	1.839	2.124	2.28	2.106	2.004	1.379	1.2386

Tabla 23. Prueba de inflamación grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 30%

PORCENTAJE INFLAMATORIO EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA 1%

Rata	Tiempo (horas)							
	1	2	3	4	5	6	24	48
1	40.756	81.377	103.1	83.266	82.321	78.543	22.807	16.194
2	33.198	71.93	124.83	116.33	122.94	89.879	34.143	19.973
3	56.815	79.487	104.99	122	109.72	94.602	35.088	21.862
4	63.428	82.321	99.325	137.11	83.266	101.21	37.922	17.139
5	40.756	70.04	103.1	143.72	116.33	57.76	37.922	16.194
6	65.317	74.764	90.823	110.66	94.602	102.16	19.973	18.084
7	39.811	55.87	78.543	92.713	83.266	101.21	23.752	9.5816
Promedio	48.58	73.68	100.67	115.11	98.92	89.34	30.23	17.00

Tabla 24. Porcentaje inflamatorio grupo Nanogeles PEGMA/MAOB 30%

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aderibigbe, B. A. and Naki, T. (2018) 'Design and efficacy of nanogels formulations for intranasal administration', *Molecules*, 23(6). doi: 10.3390/molecules23061241.
- Arulselvan, P. *et al.* (2016) 'Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. doi: 10.1155/2016/5276130.
- Baron, R. (2000) 'Peripheral neuropathic pain: From mechanisms to symptoms', *Clinical Journal of Pain*. doi: 10.1097/00002508-200006001-00004.
- Bell, A. (2018) 'The neurobiology of acute pain', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd., 237, pp. 55–62. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.05.004.
- Beura, L. K. *et al.* (2016) 'Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice', *Nature*. Nature Publishing Group, 532(7600), pp. 512–516. doi: 10.1038/nature17655.
- Cardozo, A. *et al.* (2007) 'El Animal como sujeto experimental Aspectos técnicos y éticos', *Aspectos técnicos y éticos*, p. 228. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Chen, K. H. *et al.* (2015) 'Nanoparticle distribution during systemic inflammation is size-dependent and organ-specific', *Nanoscale*, 7(38), pp. 15863–15872. doi: 10.1039/c5nr03626g.
- Cornejo-bravo, J. M. *et al.* (2005) 'Drug release from complexes with a series of poly (carboxyalkyl methacrylates), a new class of weak polyelectrolytes', 305, pp. 52–60. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.08.023.
- Cossio-Bolaños, M. *et al.* (2013) 'Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats', *Nutricion Hospitalaria*, 28(6), pp. 2151–2156. doi: 10.3305/nh.2013.28.6.6659.
- Coussens, L. M. and Werb, Z. (2002) 'Inflammation and cancer', 420(December).
- Cuéllar, D. L. *et al.* (2008) 'Acido salicílico', pp. 108–112.
- Dinareello, C. A. (2010) 'revisión Anti-inflamatorio Agentes : presente y futuro', pp. 935–950.

Doctoral, M. T. *et al.* (2014) 'Barcelona, Junio de 2014 Programa de Doctorado en Medicina Tesis Doctoral dirigida por Francisco Javier Santos Vicente, María Vicario Pérez y Josep Àngel Bosch Gil'.

Erdmann, L., Macedo, B. and Urich, K. E. (2000) 'Degradable poly (anhydride ester) implants : e ! ects of localized salicylic acid release on bone', 21, pp. 2507–2512.

Gautam, R. and Jachak, S. M. (2009) 'Recent Developments in Anti- In £ ammatory Natural Products', 29(5). doi: 10.1002/med.

Germolec, D. R. *et al.* (2018) 'Markers of inflammation', *Methods in Molecular Biology*, 1803, pp. 57–79. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4_5.

Inflamatorio, E. L. P. (2018) '17/10/2018 el proceso inflamatorio', pp. 5–8.

Jain, K. K. (2005) 'Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics', *Clinica Chimica Acta*, 358(1–2), pp. 37–54. doi: 10.1016/j.cccn.2005.03.014.

Kabanov, A. V and Vinogradov, S. V (2009) 'Nanogels as Pharmaceutical Carriers : Finite Networks of Infinite Capabilities Angewandte', pp. 5418–5429. doi: 10.1002/anie.200900441.

Korniluk, A. *et al.* (2017) 'From inflammation to cancer', *Irish Journal of Medical Science*. Springer London, 186(1), pp. 57–62. doi: 10.1007/s11845-016-1464-0.

Kuprash, D. V and Nedospasov, S. A. (2016) 'Moleculares y celulares mecanismos de inflamación', 81(11), pp. 1237–1239.

Kuramoto, T. *et al.* (2012) 'Origins of albino and hooded rats: Implications from molecular genetic analysis across modern laboratory rat strains', *PLoS ONE*, 7(8), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0043059.

Lechuga Laura (2005) 'Nanomedicina: aplicacion de la nanotecnología en la salud', *Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2) Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, p. 15. Available at: http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf.

Maity, A. R. and Stepensky, D. (2015) 'Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: analysis of research trends and targeting efficiencies', *Elsevier B.V.* Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.053.

Marinho, K. *et al.* (2018) 'Salicytamide : a New Anti-inflammatory Designed Drug Candidate'. *Inflammation*. doi: 10.1007/s10753-018-0783-x.

Mura, S., Nicolas, J. and Couvreur, P. (2013) 'Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 12(11), pp. 991–1003. doi: 10.1038/nmat3776.

Navas, P. and Gonz, N. M. M. (2008) 'Bases neuromédicas del dolor', *Clínica y Salud*, 19(3), pp. 277–293.

Necas, J. and Bartosikova, L. (2013) 'Carrageenan : a review', 2013(4), pp. 187–205.

Niv, D. and Devor, M. (2004) 'Chronic Pain as a Disease in its Own Right', *Pain Practice*, 4(3), pp. 179–181. doi: 10.1111/j.1533-2500.2004.04301.x.

Ouimet, M. A. *et al.* (2015) 'Poly(anhydride-ester) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) blends: Salicylic acid-releasing blends with hydrogel-like properties that reduce inflammation', *Macromolecular Bioscience*, 15(3), pp. 342–350. doi: 10.1002/mabi.201400238.

Piktel, E. *et al.* (2019) 'Inhibition of inflammatory response in human keratinocytes by magnetic nanoparticles functionalized with PBP10 peptide derived from the PIP2 - binding site of human plasma gelsolin', *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central, pp. 1–19. doi: 10.1186/s12951-019-0455-5.

Posadas, I. *et al.* (2004) 'Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic , age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression', pp. 331–338. doi: 10.1038/sj.bjp.0705650.

Prosperi, D. *et al.* (2017) 'Seminars in Immunology Drug nanocarriers to treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases', *Seminars in Immunology*. Elsevier, (August), pp. 0–1. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.010.

Rojas-aguirre, Y. (2016) 'Química del dolor', pp. 286–291.

Royal Society of Chemistry (2015) 'Salicylic acid', *Chemspider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.331.html?rid=f62a8541-5023-48ed-80d0-a41b933d065a>.

- Serrano-Medina, A., Cornejo-Bravo, J. M. and Licea-Claveríe, A. (2012) 'Synthesis of pH and temperature sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization', *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier Inc., 369(1), pp. 82–90. doi: 10.1016/j.jcis.2011.12.045.
- Sousa-neto, B. P., Gomes, B. S. and Cunha, F. V. M. (2018) 'Antiedematogenic activity of the indole derivative N-salicyloyltryptamine in animal models', 90, pp. 185–194.
- Torchilin, V. P. (2014) 'nanoparticulate systems for drug delivery', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (October). doi: 10.1038/nrd4333.
- Vane, J. R. and Botting, R. M. (2003) 'The mechanism of action of aspirin', 110, pp. 255–258. doi: 10.1016/S0049-3848(03)00379-7.
- Varela, M. L. *et al.* (2018) 'Acute Inflammation and Metabolism', *Inflammation*. Inflammation, 41(4), pp. 1115–1127. doi: 10.1007/s10753-018-0739-1.
- Vinogradov, S. V, Bronich, T. K. and Kabanov, A. V (2002) 'Nanosized cationic hydrogels for drug delivery : preparation , properties and interactions with cells', 54, pp. 135–147.
- Yang, C. *et al.* (2020) 'Magnesium oil enriched transdermal nanogel of methotrexate for improved arthritic joint mobility, repair, and reduced inflammation', *Journal of Microencapsulation*. Taylor & Francis, 37(1), pp. 77–90. doi: 10.1080/02652048.2019.1694086.
- Yupanqui, T. and Lorena, C. (2014) 'Revista de Actualización Clínica Volumen 43 2014', pp. 2266–2270.
- Zhao, Y. (2018) 'Nanomedicine in China', *Advanced Healthcare Materials*, 7(20), pp. 1–2. doi: 10.1002/adhm.201801051.