La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE© 2023. Todos los derechos reservados

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



Maestría en Ciencias en Nanociencias

Efecto del resveratrol nanoencapsulado en la viabilidad de cultivos de adipocitos en monocapa y esferoidales

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Daniela Molina Estrada

Ensenada, Baja California, México 2023 Tesis defendida por Daniela Molina Estrada

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno Codirectora de tesis Dr. Rafael Vázquez Duhalt Codirector de tesis

Dra. María Teresa Viana Castrillón

Dra. Katrin Quester

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez



Dra. Catalina López Bastidas Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo Directora de Estudios de Posgrado

Copyright © 2023, Todos los Derechos Reservados, CICESE Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE Resumen de la tesis que presenta **Daniela Molina Estrada** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Efecto del resveratrol nanoencapsulado en la viabilidad de cultivos de adipocitos en monocapa y esferoidales

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno Codirectora de tesis Dr. Rafael Vázquez Duhalt Codirector de tesis

La obesidad es una enfermedad de alta prevalencia en México y a nivel mundial que se caracteriza por el aumento de tejido adiposo provocando daños en el organismo. La farmacoterapia contra este padecimiento es escasa por ello se han estudiado fitoquímicos que pueden afectar la adipogénesis; como el resveratrol (RES), compuesto polifenólico presente en algunas plantas y frutos como: arándanos, uvas, moras, etc. El RES ha demostrado inhibir la lipogénesis y la diferenciación de adipocitos. El conocimiento de diferenciación del adipocito es esencial para comprender la obesidad. Proceso que se ha estudiado ampliamente en la línea celular 3T3-L1 en modelos de cultivo celular bidimensionales (2D) en forma de monocapa. Sin embargo, éste no logra imitar el microambiente nativo tridimensional (3D). Por tanto, en el presente trabajo se evalúo el efecto en la viabilidad de preadipocitos 3T3-L1 cultivados en monocapa (2D) y esferoides (3D) con nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol (NPs-QR) y tratadas con lisina (NPs-QRL). Además, la capacidad del guitosano como nanoportador de resveratrol. Se logró sintetizar nanopartículas (NPs-QR) con morfología esférica. En solución las NPs-QR presentaron un diámetro hidrodinámico de 295 ±332 nm, con un potencial zeta de 34 ±9 mV; mientras que para las NPs-QRL fue de 944 ±98 nm y 17 ±4 mV, respectivamente. Las NPs presentaron una eficiencia de encapsulamiento del RES del 92%. Posteriormente, el porcentaje de liberación de RES para las NPs-QRL en condiciones fisiológicas simuladas, fue del 100% en fluido gástrico y un 29% en fluido intestinal. Se estableció un método para la cuantificación de quitosano en la suspensión de nanopartículas por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por otro lado, las NPs-QR y NPs-QRL exhibieron una concentración media inhibitoria (IC₅₀) para los preadipocitos 3T3-L1 en 2D de 118 \pm 12 y 112 \pm 13 µg/mL y en 3D de 26 \pm 11 y 71 ±16 μg/mL, respectivamente. La citotoxicidad de las NPs también fue evaluada en hepatocitos de la línea celular AML-12. Por tanto, nuestros resultados demuestran la capacidad del quitosano como nanoportador y la capacidad del RES como agente citotóxico.

Abstract of the thesis presented **by Daniela Molina Estrada** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Effect of nanoencapsulated resveratrol on the viability of monolayer and spheroidal adipocyte cultures

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno Thesis Codirector

Dr. Rafael Vázquez Duhalt Thesis Codirector

Obesity is a highly prevalent disease in Mexico and is worldwide is characterized by increased adipose tissue, causing health problems. Pharmacotherapy against this condition is scarce; therefore, phytochemicals that can affect adipogenesis have been studied, such as resveratrol (RES), a polyphenolic compound in some plants and fruits such as blueberries, grapes, and blackberries, among others. RES has been shown to inhibit lipogenesis and adipocyte differentiation. Knowledge of adipocyte differentiation is essential to understanding obesity. This process has been extensively studied in the 3T3-L1 cell line in two-dimensional (2D) cell culture models in monolayer form, but this fails to mimic the native three-dimensional (3D) microenvironment. Therefore, in the present work, we evaluated the effect of chitosan nanoparticles loaded with resveratrol (NPs-QR) and treated with lysine (NPs- QRL) on the viability of preadipocytes cultured in monolayer (2D) and spheroids (3D) of 3T3-L1 cells. In addition, the capacity of chitosan as a resveratrol nanocarrier. It was possible to synthesize nanoparticles (NPs-QR) with spherical morphology. In solution, the NPs-QR presented a hydrodynamic diameter of 295 ±332 nm, with a zeta potential of 34 ±9 mV, while for the NPs-QRL, it was 944 ±98 nm and 17 ±4 mV, respectively. The NPs presented a RES encapsulation efficiency of 92%. Subsequently, the percentage of RES release for NPs-QRL under simulated physiological conditions was 100% in gastric fluid and 29% in intestinal fluid. A method has been established to determine the chitosan concentration in the nanoparticle suspension using high-performance liquid chromatography (HPLC). On the other hand, NPs-QR and NPs-QRL exhibited a mean inhibitory concentration (IC₅₀) for 3T3-L1 of 118 ±12 and 112 ±13 μ g/mL in 2D and 26 ±11 and 71 ±16 μ g/mL in 3Drespectively. The cytotoxicity of the NPs was compared with the AML-12 cell line. Therefore, our results demonstrate the capacity of chitosan as a nanocarrier and the capacity of RES as a cytotoxic agent.

Dedicatoria

A mi familia, el mejor regalo que Dios me pudo haber dado.

A mis padres, quienes me han enseñado el valor de la vida. Por motivarme, inspirarme e impulsarme a lograr todo lo que yo quiera siendo mejor persona cada día. Por su amor infinito, por su apoyo incondicional, por su confianza y por esa paciencia interminable. Por enseñarme a ver siempre oportunidades y a conquistar el miedo.

A mi hermano, quien me ha enseñado a tener optimismo en todas las circunstancias. Por estar y ser mi compañero de vida, por aceptar el pasado y tener esperanza en el futuro. Por siempre hacernos sonreír.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Autónoma Nacional de México (CNyN-UNAM) por su colaboración y apoyo en la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por haberme otorgado la beca que hizo posible llevar a cabo este proyecto.

Al Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica de Nanomateriales (SINANOTOX) por haber financiado esta investigación.

Al Departamento de Bionanotecnología y al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) por proporcionarme la infraestructura y los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno y al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su orientación y apoyo constante durante mi formación como investigador y por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Sus valiosas contribuciones y guía fueron esenciales para obtener este grado.

Al comité de tesis conformado por la Dra. María Teresa Viana Castrillón, la Dra. Katrin Quester y la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez por sus valiosas aportaciones, comentarios y tiempo dedicado a la revisión y evaluación de mi trabajo.

Al grupo Nanotoxlab por compartir sus conocimientos y experiencia en el campo de la nanotoxicología, en especial a la M.C. Elizabeth Mavil Guerrero por su paciencia, enseñanzas y dedicación en cultivo celular.

A mis amigos Kevin, Eli y Will por brindarme su apoyo incondicional durante todo el proceso de investigación, en el laboratorio y en mi estancia en Ensenada.

Y especialmente a Jorge Alejandro Ontiveros Robles, lo mejor que me pudo pasar en el posgrado fue encontrarte, me enseñaste lo que en realidad es la amistad. Gracias por todo, absolutamente TODO. Te quedas para siempre en mi corazón.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi

Capít	ulo 1.	Introducción1	L
1.1	Ante	ecedentes	3
	1.1.1	Obesidad	3
	1.1.2	Tejido Adiposo5	5
	1.1.3	Adipocitos6	5
	1.1.4	Farmacoterapia8	3
	1.1.5	Fitoquímicos contra la obesidad 10)
	1.1.6	Nanoencapsulación	1
	1.1.7	Cultivo celular 2D y 3D 15	5
1.2	Hipć	tesis	7
1.3	Obje	etivos 17	7
	1.3.1	Objetivo general	7
	1.3.2	Objetivos específicos	7

Capítul	2. Metodología1	8
2.1	Síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol 1	8
2	1.1 Caracterización por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis)1	9

	2.1.2 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta	. 19
	2.1.3 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	. 19
2.2	Cuantificación y optimización del encapsulado de resveratrol	. 20
	2.2.1 Cuantificación del porcentaje de encapsulación	. 20
	2.2.2 Optimización del porcentaje de encapsulación	. 20
	2.2.3 Caracterización por DLS	. 21
2.3	Liberación del resveratrol	. 21
	2.3.1 Liberación de resveratrol en condiciones fisiológicas	. 21
	2.3.2 Liberación de resveratrol en fluidos gastrointestinales simulados	. 21
	2.3.3 Punto isoeléctrico	. 22
2.4	Caracterización por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	. 23
	2.4.1 Cuantificación del quitosano presente en las nanopartículas de quitosano	. 23
	2.4.2 Determinación de glucosamina por HPLC	. 24
2.5	Cultivo celular	. 24
	2.5.1 Subcultivo o pase celular	. 25
	2.5.2 Conteo celular	. 26
	2.5.3 Criopreservación celular	. 27
	2.5.4 Descongelamiento celular	. 27
2.6	Ensayo de viabilidad	. 28
	2.6.1 Ensayo de visibilidad celular en un modelo de monocapa de células AML-12 y 3T3-L1 por reducción de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	. en . 28
	2.6.2 Crecimiento de esferoides	. 28
	2.6.3 Ensayo de visibilidad celular en un modelo esferoidal de células 3T3-L1 por reducciór bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	n de . 29

Capítı	ulo 3.	Resultados	30
3.1	Caracte	erización fisicoquímica de las nanopartículas	30
	3.1.1 Ca	aracterización por TEM	30

	3.1.2 (Caracterización por DLS y potencial zeta	31
	3.1.3 (Caracterización por DLS y potencial zeta	31
3.2	Optin	nización de las características de las nanopartículas	32
	3.2.1	Porcentaje de encapsulación de resveratrol	32
	3.2.2	Punto isoeléctrico de las nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol	34
	3.2.3 (Cuantificación de quitosano	34
3.3	Evalu	ación de la estabilidad de las nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol 3	36
	3.3.1	Liberación de resveratrol en solución PBS	36
	3.3.2	Liberación de resveratrol en fluidos simulados	36
3.4	Viabil	lidad celular	38
Capít	ulo 4.	Discusión	12
Capít	ulo 5.	Conclusiones	51
Litera	itura cit	tada	52

viii

Lista de figuras

Figura	Página
1. Distribución del TA en el cuerpo humano	5
2. Diferenciación de CMM en adipocitos.	6
3. Mecanismo de síntesis de ácidos grasos en adipocitos	8
4. Fitoquímicos vegetales	10
5. Principales mecanismos implicados en el efecto antiadipogénico del resveratrol	11
6. Inhibición de la lipogénesis de las células 3T3-L1	12
7. Efecto del resveratrol en la acumulación de triglicéridos (TG).	13
8. Comparación del cultivo celular 2D y 3D.	16
9. Esquema de la cámara de Nuebauer para el conteo celular	26
10. Caracterización fisicoquímica de las NPs-Q por TEM	30
11. Caracterización del radio hidrodinámico y el potencial zeta por DLS	31
12. Espectro de absorción UV-Vis del RES no encapsulado	32
13. Curva de calibración de RES	32
14. Diámetro hidrodinámico de las NPs-QR sintetizadas con diferentes volúmenes de RES	33
15. Estabilidad de las NPs-QR a diferentes pH	34
16. Mecanismo de derivatización de la glucosamina	35
17. Curva de calibración de la glucosamina por amidación reductiva	35
18. Cinéticas de liberación del RES	36
19. Cinéticas de liberación de resveratrol en fluidos simulados	37
20. Evolución del diámetro hidrodinámico de las NPs-QRL frente al fluido simulado	37
21. Evaluación de la viabilidad celular de las células de hígado (AML-12)	38
22. Alteración en la morfología de las células AML-12	39
23. Evaluación de la viabilidad celular de preadipocitos (3T3-L1) en cultivo 2D	40

24. Evaluación de la viabilidad celular de los preadipocitos (3T3-L1) en cultivos 3D	41
25. Estructura química del quitosano	45
26. Mecanismo propuesto de despolimerización del quitosano	46
27. Mecanismo propuesto de desacetilación de N-acetilglucosamina	47

Lista de tablas

Tabla

Página

1. Clasificación de la obesidad según la OMS.	4
2. Constituyentes del fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado	22
3. Gradiente de elución por HPLC para la determinación de glucosamina en quitosano	24
4. Optimización del porcentaje de encapsulación de RES	33
5. La mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC $_{50}$) de las NP y RES libre	41
6. Cálculos teóricos de las longitudes de onda de absorción del espectro de UV-Vis del RES	44

La obesidad es la acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo en el organismo que puede causar daños a la salud (González-Muniesa et al., 2017). Es una enfermedad multifactorial compleja en la que el exceso de grasa corporal acumulada puede dar lugar al desarrollo de *diabetes mellitus*, enfermedad cardiovascular, hipertensión e hiperlipidemia (Lin and Li, 2021). Además, en los últimos 50 años, la obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública (Panuganti et al., 2022). Debido a que el exceso de peso no deseado es el principal impulsor del aumento mundial de las enfermedades no transmisibles (Keaver et al., 2020; Zatońska et al., 2021).

El control de peso se puede lograr mediante un déficit calórico, con ejercicio físico óptimo y una dieta hipocalórica. Sin embargo, cuando esto no es suficiente se recomienda un tratamiento farmacológico (Ruban et al., 2019). La búsqueda de medicamentos contra la obesidad ha sido desafiante por razones técnicas y sociales. Diversos fármacos se han propuesto para la pérdida de peso, no obstante, han mostrado severos efectos secundarios que no compensan el beneficio observado. Por ejemplo, la sibutramina, fenfluramina, dexfenfluramina han mostrado desencadenar diversos efectos cardiovasculares severos. El rimonabant incrementa el riesgo de suicidio mientras que las metanfetaminas causan una marcada farmacodependencia (Müller et al., 2022).

Debido a los indeseables efectos secundarios que provocan los fármacos antes mencionados, se han propuesto alternativas, como el uso de compuestos de origen natural (Mohamed et al., 2014). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas medicinales son una de las mejores fuentes para obtener una amplia variedad de medicamentos que se usan en la actualidad en la medicina de patente. Sin embargo, aunque estos productos sean de origen natural es necesario realizar estudios desde el punto de vista de toxicidad o inocuidad, su distribución en el organismo una vez consumido, sus estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos (Mopuri and Islam, 2017).

Un compuesto de origen natural, el resveratrol (RES) es un polifenólico presente en numerosas plantas y frutos como cacahuates, moras, arándanos, la uva y el vino tinto (Gambini et al., 2013). En modelos animales, ha demostrado tener propiedades benéficas como el aumento de la longevidad, mejoras en la función motora y efectos favorables para bajar de peso, así como la reducción de la grasa corporal total y la disminución de los depósitos de tejido adiposo blanco (Tabrizi et al., 2020). También, se ha demostrado su capacidad para inhibir la diferenciación de preadipocitos, la disminución de la proliferación de

adipocitos y la capacidad de inducir apoptosis en estas células (Aguirre et al., 2014; Fischer-Posovszky et al., 2010).

Aunque el RES ha destacado por ser un buen agente terapéutico, es una molécula altamente inestable en su forma *trans*. La forma *cis* es estable, sin embargo, esta estructura es terapéuticamente inactiva. La mayoría de las formulaciones disminuye su periodo de vida útil debido al rápido metabolismo de *trans* a *cis* (Salehi et al., 2018). Otra desventaja del RES es ser hidrófoba con una biodisponibilidad extremadamente baja debido a su estructura cristalina altamente organizada. Se ha reportado que el RES es estable en rangos de pH ácidos superiores a 6 y es altamente soluble en solventes orgánicos (Monika et al., 2017). Para solucionar el problema de la biodisponibilidad, se ha optado por su nanoencapsulación.

La nanoencapsulación de agentes terapéuticos ha demostrado aumentar su eficacia, especificidad y capacidad de focalización. Aquellas nanopartículas (NPs) cargadas con fármacos se denominan como nanoportadores, los cuales protegen su carga de la degradación prematura en el entorno biológico, mejoran su biodisponibilidad y prolongan su presencia en la sangre y la captación celular (Kumari et al., 2014).

Los métodos de síntesis se eligen según la estructura química del agente terapéutico, el tipo de aplicación y el tiempo de retención dentro del cuerpo. Uno de estos métodos es la encapsulación biopolimérica, en donde se fabrican nanotransportadores a partir de ingredientes naturales como proteínas. De tal manera que proporcionan una barrera polimérica contra la luz, el oxígeno y el calor, lo que da como resultado una mayor estabilidad (Jeon et al., 2016).

Un polímero que se ha utilizado en la encapsulación biopolimérica es el quitosano. Es un polisacárido compuesto por glucosamina y N-acetilglucosamina. Se considera generalmente como un polímero de origen natural biocompatible y lentamente biodegradable (Periayah et al., 2016). También está en desarrollo como un excipiente seguro en formulaciones de medicamentos (Patil et al., 2021). Además, se ha reportado que el quitosano es un potenciador de absorción eficiente debido a sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para abrir transitoriamente uniones estrechas entre células epiteliales (Jeon et al., 2016).

Para comprender y demostrar lo que le sucede al fármaco una vez que entra al organismo y como es que sus propiedades fisicoquímicas se ven alteradas, una vez que este se ha internalizado en el individuo, se han realizado evaluaciones biológicas durante muchos años. Tanto *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con el fin de

imitar lo mejor posible el microambiente *in vivo* en estudios preclínicos ya que es importante que el modelo experimental simule de la manera más fiel las condiciones fisiológicas (Abdelsayed et al., 2022; Bhagat and Singh, 2022).

El cultivo celular bidimensional (2D) ha sido el método utilizado para cultivar células desde principios del siglo XX. Juega un papel vital en la investigación, pero tiene muchas limitaciones debido a que los modelos 2D representan de forma imprecisa las células de los tejidos *in vitro*. Los métodos nuevos y mejorados implementan técnicas de cultivo de células tridimensionales (3D) y pueden proporcionar evidencia convincente debido a que estos simulan mejor lo que sucede en un tejido. La simulación de entornos celulares fisiológicos *in vitro* en cultivos tridimensionales de adipocitos ayuda a entender los mecanismos de acción farmacológica a nivel molecular. Generar tratamientos efectivos para la obesidad y otras enfermedades crónicas asociadas a esta patología (Jensen and Teng, 2020). Por otra parte, el buscar alternativas naturales y al mismo tiempo aprovechar las nuevas tecnologías permitirá desarrollar nanomateriales para prevenir, mejorar y combatir enfermedades de alta prevalencia como la obesidad, así como a contribuir al desarrollo de conocimiento sobre el área de la nanotoxicología (Sibuyi et al., 2019).

Por tanto, en el presente trabajo se realizó la comparación del efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol en la viabilidad de preadipocitos 3T3-L1 cultivados en monocapa (2D) y esferoides (3D). Este trabajo aporta información valiosa sobre los mecanismos celulares de una formulación de RES encapsulado en nanopartículas de quitosano en un modelo 3D que emula con mayor precisión, las condiciones fisiológicas reales del tejido adiposo.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Obesidad

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo (TA) en el individuo. Suele acompañarse de inflamación sistémica crónica leve. Además, está relacionada con el índice de masa corporal (IMC), de tal manera que un IMC por encima de 25 Kg/m² generalmente se considera sobrepeso y mayor a 29.9 Kg/m² se clasifica como obesidad en algunos de sus grados (Fruh, 2017; Lin and Li, 2021). La clasificación actual de obesidad propuesta por la OMS se basa en el IMC, la cual corresponde a la relación entre el peso expresado en kilogramos y el cuadrado de la altura, expresada en metros cuadrados. La siguiente tabla muestra la clasificación de la obesidad según la OMS (**Tabla 1**) (Novosad et al., 2013).

Clasificación	IMC (Kg/m ²)	Riesgo asociado a la salud
Normo peso	18.5 – 24.9	Promedio
Exceso de peso	≥ 25	Aumentado
Sobrepeso o Pre-obeso	25 -29.9	Aumentado
Obesidad Grado I o moderada	30 - 34.9	Aumentado moderado
Obesidad Grado II o severa	35 -39.9	Aumentado severo
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40	Aumentado muy severo

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS.

El aumento de la deposición de TA es un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto de energía, generalmente asociado a una baja actividad física (un estilo de vida sedentario) y un consumo excesivo de alimentos con un contenido energético por encima de las necesidades del individuo (González-Muniesa et al., 2017). El exceso de energía se almacena en las células en forma de grasa, desarrollando así la patología característica de la obesidad (Lin and Li, 2021). Aunque factores genéticos, hormonales e incluso el uso de ciertos medicamentos también puede causar sobrepeso u obesidad (Geliebter et al., 2014; Wharton et al., 2020).

En la actualidad la obesidad se ha convertido es uno de los problemas de salud pública más grandes a nivel mundial. En las últimas cinco décadas la tasa de prevalencia se ha multiplicado por seis (González-Muniesa et al., 2017). Además, tan solo en 2016, 1900 millones de adultos tenían sobrepeso en todo el mundo de los cuales cerca de 340 millones correspondía a sobrepeso u obesidad en niños y adolescentes (World Health Organization (WHO), 2021). Para el año 2017 fue asociada a 4.7 millones de muertes prematuras a nivel mundial, posicionándose como una de las principales causas de mortalidad (Ritchie and Roser, 2017). Por otro lado, las personas con sobrepeso u obesidad corren un mayor riesgo de padecer y exacerbar otras enfermedades como, hipertensión, diabetes tipo 2, osteoartritis, problemas respiratorios (asma y apnea del sueño), problemas psicosociales y algunos tipos de cáncer (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2022).

1.1.2 Tejido Adiposo

El TA es un tipo de tejido conectivo, que se compone principalmente de adipocitos, un tipo de célula especializada en el almacenamiento de energía a través de grandes depósitos de lípidos (es decir, grasa) (Luo and Liu, 2016). Además, los adipocitos están estrechamente empaquetados con fibras colágenas y elásticas, que a su vez están rodeados por células vasculares del estroma. Las células vasculares del estroma incluyen preadipocitos, células del sistema inmunitario (macrófagos y leucocitos), células endoteliales (vasos sanguíneos y linfáticos) y células madre/estromales (Ramakrishnan and Boyd, 2018). En conjunto, estos tipos de células cumplen la función principal en el depósito de energía y en el metabolismo energético (Choe et al., 2016).



Figura 1. Distribución del TA en el cuerpo humano. (A) El TAB se distribuye principalmente en la en la región subcutánea en la parte superior (abdomen profundo y superficial) e inferior (glúteo-femoral), así como en la región visceral (omental, mesentérica, mediastínica y epicárdica. (B) Diferencias estructurales y morfológicas entre el TAB, TAM y tejido adiposo beige. Como se muestra en el dibujo y la tinción con hematoxilina/eosina (aumento × 40). Modificado de Kwok et al., 2016.

En los seres humanos, el TA se clasifica principalmente en dos tipos, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM) (Choe et al., 2016). El TAB representa la mayor proporción de TA en el cuerpo

y se encarga de almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos, así como liberar ácidos grasos al torrente sanguíneo cuando se requiera. Por otro lado, el TAM está especializado en utilizar y disipar la energía derivada de los lípidos para producir calor. El TAB se encuentra disperso en el cuerpo, los principales depósitos se encuentran en el abdomen profundo y superficial, glúteo-femoral y región visceral (**Figura 1**) (Kwok et al., 2016).

1.1.3 Adipocitos



Figura 2. Diferenciación de CMM en adipocitos. Diferenciación de células madre mesenquimales en adipocitos blancos y marrones. (1) Las vías de señalización GSK3β y β-catenina-WNT derivan en linaje de adipocitos blancos y adipocitos marrones/miocitos, respectivamente. (2) PRDM16 es un poderoso inductor y mantenedor del fenotipo termogénico tanto en el desarrollo de adipocitos blancos como marrones. Myf5 participa en la diferenciación muscular, generando musculo esquelético. (3) CEBPa/b desencadenar la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros. Modificado de Rodgers and Sferruzzi-Perri, 2021.

Los adipocitos blancos se originan a partir de células madre mesenquimales (CMM) en un proceso de diferenciación de dos pasos. Las CMM se diferencian en adipoblastos, seguidas en preadipocitos y finalmente en adipocitos. Aunque existen tres tipos de adipocitos (blanco, marrón y beige) con cascadas transcripcionales similares, hay diferencias clave que promueven la diferenciación de uno sobre otro (Rodgers and Sferruzzi-Perri, 2021).

En la diferenciación de CMM hacia adipocitos están involucrados factores de transcripción, expresión de genes específicos que reflejan la aparición de proteínas y la acumulación de triglicéridos (TG). Dentro de los principales factores se encuentran, la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), específicamente BMP2 y BMP4, así como PPARy y C/EBPs (**Figura 2**), fundamentales para impulsar estas diferentes fases (Reddy et al., 2014).

Morfológicamente, los adipocitos blancos tienen una forma esférica con un diámetro 10 a 120 µm (Fitzgerald et al., 2018). También contienen una sola gota de lípidos que ocupa la mayor parte del citoplasma, la cual desplaza el núcleo y los organelos hacia la periferia (**Figura 3A**) (Lee et al., 2021). Los lípidos se acumulan a través de la captación de ácidos grasos o de la lipogénesis. La biosíntesis de ácidos grasos se lleva a cabo mediante reacciones enzimáticas sucesivas (Sethi and Vidal-Puig, 2007). Primero, se obtiene glucosa de los carbohidratos, seguido la glucosa se somete al proceso de glucólisis y al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para producir citrato en la mitocondria, que se transporta al citosol y luego libera acetil coenzima A (acetil-CoA) mediante la ATP-citrato liasa (ACLY). Posteriormente, la acetil-CoA resultante se convierte en malonil-CoA mediante las acetil-CoA carboxilasas 1 (ACC1).

A continuación, la sintasa de ácidos grasos (FASN), convierte el malonil-CoA en palmitato, que es el primer producto de ácido graso. Finalmente, el palmitato sufre las reacciones de elongación y desaturación para generar los ácidos grasos complejos, incluidos el ácido esteárico, el ácido palmitoleico y el ácido oléico (**Figura 3B**) (Song et al., 2018). Subsecuentemente, los adipocitos emplean los ácidos grasos y unen tres de estos a una molécula de glicerina (glicerol), formando triglicéridos, la principal reserva de energía desde la cual se liberan los ácidos grasos según sea necesario (Sniderman et al., 1998).

En condiciones saludables, el TAB almacena el exceso de energía de una manera que no es tóxica para el adipocito. Sin embargo, cuando la ingesta calórica es mayor al gasto de energía, los lípidos se acumulan, los adipocitos aumentan de tamaño, un fenómeno llamado hipertrofia, y finalmente el TA se expande (Chakarov et al., 2022). En respuesta, el TA reacciona al entorno cambiante de nutrientes, lo que genera trastornos en la síntesis de moléculas bioactivas, tales como adipocinas y citocinas, que afectan el

metabolismo tanto de los lípidos como de la glucosa y como consecuencia puede conducir a la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Kojta et al., 2020).



Figura 3. Mecanismo de síntesis de ácidos grasos en adipocitos. A) Características de los adipocitos blancos. UCP1, proteína de desacoplamiento mitocondrial responsable de la termogénesis en el TAM. LD, gota de lípidos. Modificado de Lee et al., 2021. B) Al consumir carbohidratos, los adipocitos toman una parte de la glucosa circulante mediante la proteína transportadora GLUT4. A continuación, mediante la glucólisis en el citosol, la glucosa se convierte en piruvato. El piruvato se transporta a las mitocondrias para su posterior oxidación en el TCA. El citrato obtenido en el TCA, se exporta al citosol y se usa como sustrato para la vía de la lipogénesis *de novo* (DNL). Posteriormente, se activan las proteínas ATP-citrato liasa (ACLY), acetil-CoA carboxilasas 1 (ACC1), ácido graso sintasa (FASN), estearoil-CoA desaturasa-1 (SCD1) promoviendo la síntesis de ácidos grasos. FATP: proteína de transporte de ácidos grasos 1; IR: receptor de insulina. Modificado de Song et al., 2018.

1.1.4 Farmacoterapia

La farmacoterapia es el uso de sustancias terapéuticas para el tratamiento de un trastorno o enfermedad (Holford, 2015). En el sobrepeso y la obesidad existen medidas preventivas que hacen hincapié en la nutrición sostenible, la actividad física y los cambios en el comportamiento, que han demostrado ser eficientes. Sin embargo, las intervenciones en el estilo de vida que incluyen la restricción calórica y/o el control de las porciones por sí solas son insuficientes para lograr el mantenimiento de la pérdida de peso a largo plazo en la mayoría de los pacientes (Tchang et al., 2022). Los objetivos del tratamiento de la obesidad son mejorar o prevenir las complicaciones de las enfermedades metabólicas, no la pérdida de peso en sí (Joo and Lee, 2014). El manejo clínico de los pacientes obesos a menudo es complicado ya sea por la edad, el sexo, la gravedad de la obesidad, las causas subyacentes, las complicaciones relacionadas con la obesidad, los factores psicosociales, así como las preferencias del paciente y de la familia (Salari et al., 2021).

La farmacoterapia contra la obesidad está llena de contradicciones y dilemas relacionados a la seguridad, eficacia, abuso y efectos adversos (Álvarez, 2012). Aunque la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado ciertos medicamentos que pueden usarse en el tratamiento de la obesidad como complemento de la modificación del estilo de vida a menudo son insuficientes para alcanzar los objetivos de pérdida de peso (Montan et al., 2019). Medicamentos como sibutramina, un inhibidor altamente selectivo de la recaptación de noradrenalina y serotonina en las terminaciones nerviosas se retiró del mercado después de que se informaron eventos adversos cardiovasculares relacionados a la farmacoterapia y que no se presentaron en el grupo de placebo (Luque and Rey, 2002). También, la fenilpropanolamina se eliminó del mercado farmacéutico en los Estados Unidos debido a un mayor riesgo de eventos vasculares cerebrales asociados a este fármaco, cuando se usa como agente terapéutico para perder peso en mujeres (Kernan et al., 2000). En el caso de fenfluramina y fentermina se ha informado que causan hipertensión pulmonar como efecto secundario. Otro fármaco, orlistat (tetrahidrolipstatina) se ha asociado con varios efectos adversos gastrointestinales de leves a moderados, como heces aceitosas, diarrea, dolor abdominal y manchado fecal. También, se han notificado algunos casos de efectos adversos hepáticos graves (colelitiasis, hepatitis colostática e insuficiencia hepática subaguda) (Filippatos et al., 2008).

Es por eso que actualmente, la mayoría de las guías recomiendan la farmacoterapia como tratamiento de segunda línea para la obesidad (después de la modificación del estilo de vida) con dispositivos bariátricos y cirugía como tratamientos de tercera y cuarta línea, respectivamente (Montan et al., 2019). La seguridad de los medicamentos para el tratamiento de la obesidad se ve socavada por la falta de comprensión de la fisiopatología de la obesidad, la falta de una buena terapia, la aceptación y el uso deficientes de la terapia y el cumplimiento de esta. También existen problemas regulatorios y sociales. La historia de los medicamentos contra la obesidad está plagada de casos de promesas tempranas, pero fracasos tardíos (Li and Cheung, 2011). No se comprenden los mecanismos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, psicológicos, conductuales y sociales que causan la obesidad lo suficientemente bien como para prevenirla o revertirla de manera efectiva. Muchos medicamentos tratan solo una parte de esta compleja interacción y producen efectos secundarios inaceptables. Así, a pesar de los resultados favorables en términos de reducción de peso corporal, la mayoría de los fármacos antiobesidad desarrollados hasta el momento no han sido aprobados o han sido retirados del mercado debido a importantes efectos adversos; es por ello que existe una necesidad urgente de nuevos fármacos contra la obesidad (Cheung et al., 2013).

Como alterativa a los medicamentos sintéticos tradicionales se ha explorado el uso de compuestos químicos producidos por plantas (fitoquímicos). Sin embargo, el poder de las plantas, las hierbas y sus

derivados para el tratamiento de la obesidad aún no se ha explorado ampliamente, y puede ser una excelente alternativa para desarrollar medicamentos seguros y eficaces contra la obesidad, basados en productos naturales (Freitas and Almeida, 2017).

1.1.5 Fitoquímicos contra la obesidad

El potencial de los fitoquímicos se debe a que la naturaleza representa una enorme reserva de compuestos biológicamente activos para tratar diversas dolencias (Sánchez-Ramos et al., 2021). En vista de los efectos secundarios encontrados con el uso prolongado de drogas sintéticas y debido a las estrictas pautas que deben cumplirse durante la aprobación de medicamentos, los medicamentos a base de plantas y hierbas han ganado mucha atención como una opción confiable para el remedio clínico, por lo que el uso de estos remedios a base de hierbas va en aumento (Karimi et al., 2015; Welz et al., 2018).



Figura 4. Fitoquímicos vegetales. Estructura de fitoquímicos comunes. Modificado de Soltys et al., 2021.

Una variedad de fitoquímicos, como, polifenoles, alcaloides, terpenoides, flavonoides, taninos, saponinas, glucósidos, los esteroides y las proteínas presentes en las plantas y sus productos son factores clave en el tratamiento de varios trastornos (**Figura 4**) (Soltys et al., 2021). Los fitoquímicos como fuente de nuevos medicamentos abre un amplio campo para la investigación científica debido a la abundante disponibilidad

de especies conocidas (250,000 – 500,000), de las cuales solo un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y su potencial farmacológico evaluado Mujeeb et al., 2014.

El RES (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno), pertenece al grupo de los estilbenoides de los polifenoles, posee dos anillos fenólicos unidos entre sí por un puente etileno (Ramírez-Garza et al., 2018). Este polifenol natural se ha detectado en más de 70 especies de plantas, especialmente en la piel y las semillas de la uva, y se ha encontrado en cantidades discretas en vinos tintos y diversos alimentos para humanos (Koushki et al., 2018).



Figura 5. Principales mecanismos implicados en el efecto antiadipogénico del resveratrol. ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACO: Acil-CoA oxidasa; TAM: tejido adiposo marrón; C/EBP: CCAAT/proteína de unión al potenciador; CPT: carnitina palmitoiltransferasa; FASN: ácido graso sintasa; LPL: lipoproteína lipasa; PPAR: receptor activado por proliferador de peroxisomas; UCP: Proteína desacopladora; TAB: Tejido adiposo blanco. Modificado de Aguirre et al., 2014.

El RES es una fitoalexina que numerosos estudios han demostrado que posee un potencial antioxidante muy alto, tiene efecto antiinflamatorio, exhibe actividad antitumoral y se considera un candidato potencial para combatir el sobre peso y la obesidad (Chang et al., 2011). El RES tiene un efecto antiadipogénico e interviene en varias vías metabólicas, como el metabolismo de triglicéridos del TAB, oxidación de ácidos grasos, diferenciación de adipocitos, entre otros. En la **Figura 5** se presentan los principales mecanismos implicados en el efecto antiadipogénico del RES. El RES inhibe C/EBPβ, el factor regulador temprano de la adipogénesis. Además, este polifenol también reduce la expresión de C/EBPα y PPARγ, necesarios para inducir cambios morfológicos celulares, por ejemplo: de una forma fibroblástica a una esférica. También el RES reprime la expresión del gen UCP3, el cual participa en el transporte de aniones de ácidos grasos que no pueden oxidarse, protegiendo así contra el daño mitocondrial inducido por lípidos. Por otro lado, el RES aumenta el nivel de proteína UCP1 en TAM, proteína responsable de la termogénesis (Aguirre et al., 2014).

Se ha demostrado que el RES reduce la síntesis de lípidos en el hígado de rata y en la línea celular de preadipocitos murinos 3T3-L1. Además, el RES aumenta la actividad de las sirtuinas (regulador de información de tipo de apareamiento silencioso-2, sir2), que funcionan en una amplia variedad de procesos celulares, y una familia de enzimas clave en la restricción calórica (Rayalam et al., 2008). También, el RES aumenta la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y posiblemente aumenta la eficiencia de utilización de energía en los adipocitos a través de la activación de Sirt1 (Imamura et al., 2017).

Por otro lado, Li et al., (2016) investigaron el efecto del RES durante la diferenciación adipogénica en la línea celular murina 3T3-L1 y la cepa celular SGBS humana. El RES se utilizó en concentraciones de 25, 50 y 100 μ M (**Figura 6**). Se confirmó que el RES inhibe la lipogénesis en la diferenciación de adipocitos, tanto de ratón como humanos. A nivel molecular, el efecto antilipogénico del RES parece estar mediado por un aumento atenuado de la expresión y una inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Además, está relacionado con la inhibición del aumento de masa mitocondrial y su remodelación (Li et al., 2016).



Figura 6. Inhibición de la lipogénesis de las células 3T3-L1 y SGBS, durante y después de la adipogénesis, por efecto del resveratrol. A) Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en presencia o ausencia de resveratrol en las concentraciones indicadas durante 4 u 8 días. B) Diferenciación de células SGBS en presencia o ausencia de resveratrol en las concentraciones indicadas durante 6 u 12 días. La formación de lípidos se siguió mediante tinción con Oil-Red-O. Los niveles de tinción de los preadipocitos se consideraron como un valor de 1. Los datos se presentan como media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Modificado de Li et al., 2016.

Por su parte Imamura et al. (2017) evaluaron el efecto del RES en los reguladores involucrados en el metabolismo de los lípidos utilizando pre-adipocitos 3T3-L1. Los preadipocitos 3T3-L1 se diferenciaron durante 4 días, se cultivaron durante 10 días para la acumulación de TG y luego se incubaron con RES (0, 25 o 50 μ M) durante otros 3 días más (**Figura 7**). Se observó que el RES redujo la acumulación de lípidos de manera dependiente de la concentración. También, para comprender cómo el RES regula la acumulación y el consumo de triglicéridos (TG), se investigaron los cambios en las expresiones de genes y proteínas. Se determinó que RES (25 y 50 μ M) aumentó la expresión del gen y la proteína Sirt1. Por lo tanto, el RES puede aumentar la síntesis y oxidación de ácidos grasos y posiblemente aumentar la eficiencia de utilización de energía en los adipocitos a través de la activación de Sirt1 (Imamura et al., 2017).



Figura 7. Efecto del resveratrol en la acumulación de triglicéridos (TG). A) Tinción Oil Red-O para triglicéridos en células 3T3L1. Las células 3T3L1 se trataron con o sin 25 o 50 μM de RES durante 3 días después de la diferenciación. B) Los paneles inferiores muestran gráficos que representan la relación de área (%) de la tinción Oil-red-O según lo determinado por ImageJ. Modificado de Imamura et al., 2017.

El uso del RES ha ido en aumento debido a todas las propiedades benéficas que tiene en estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Tomé-Carneiro et al., 2013). Sin embargo, los estudios clínicos disponibles en humanos han mostrado resultados controvertidos sobre los efectos protectores del RES contra las enfermedades y sus secuelas. Las razones detrás de estos hallazgos contradictorios son variadas, las diferencias en las características de los pacientes, las dosis utilizadas y la duración de la suplementación con RES. El RES parece tener un rango de dosificación efectivo diferente *in vitro* (rango micromolar en medios de cultivo celular) que su biodisponibilidad *in vivo* (rango nanomolar en la sangre), lo que dificulta identificar el rango de concentración biológicamente efectivo en el que se debe administrar este compuesto suplementado a humanos (Shaito et al., 2020).

El RES, es principalmente metabolizado a ácido glucuroníco y sulfatos conjugados, los cuales podrían retener alguna actividad biológica. Sin embargo, uno de sus inconvenientes es su poca solubilidad en agua (<0.05 mg/mL) lo que afecta su absorción, el RES *trans* es susceptible a la luz solar o artificial o radiación ultravioleta lo que afecta sus propiedades y puede sufrir procesos de autooxidación conduciendo a la producción de especies como O^{2-} y H₂O₂ lo que pueden llegar a ser citotóxicos (Gambini et al., 2015).

Debido a las desventajas presentes del RES, se ha recurrido a ciencias emergentes como, la nanotecnología. Donde el estudio y desarrollo de sistemas nanométricos presenta opciones en lo que al uso del RES se refiere, especialmente en la nanoencapsulación de agentes terapéuticos.

1.1.6 Nanoencapsulación

La nanoencapsulación de fármacos implica la formación de partículas cargadas de fármacos con diámetros que oscilan entre 1 y 1000 nm (Pinto Reis et al., 2006). La nanoencapsulación de agentes terapéuticos puede aumentar su eficacia, especificidad y capacidad de focalización. Además, protegen su carga útil de la degradación prematura en el entorno biológico, mejoran la biodisponibilidad y prolongan la presencia en la sangre y la captación celular (Kumari et al., 2014).

Las NPs poliméricas se han estudiado ampliamente como transportadores de sustancias activas en aplicaciones farmacéuticas y médicas. Han demostrado ser prometedoras como sistemas de administración de fármacos debido a sus propiedades de liberación controlada y sostenida, tamaño subcelular y biocompatibilidad con tejidos y células (Pinto Reis et al., 2006). Dentro de los polímeros, las nanopartículas de quitosano (NPs-Q) son ampliamente valoradas como un sistema de entrega de compuestos bioactivos. El quitosano se encuentra en abundancia natural, presenta biodegradabilidad y grupos funcionales de superficie en forma de grupos NH₂ (Maleki et al., 2022).

Diversos estudios, han demostrado la factibilidad del quitosano como un sistema dirigido de entrega de fármacos. Se ha reportado el uso NPs-Q como agente acarreador de fármacos anticancerígenos como el cisplatino, tamoxifeno y oxaliplatino (Sultan et al., 2022; Vivek et al., 2013; 2014). Además, se han empleado como nanoportadores de antibióticos (tetraciclina, gentamicina y ciprofloxacina) en el combate

contra infecciones bacterianas (El-Alfy et al., 2020; Li et al., 2021). También se han investigado en la entrega de enzimas intestinales, como la β -galactosidasa (Leichner et al., 2019). Y recientemente, las NP-Q se han probado en conjunto con compuestos contra la obesidad y diabetes.

Du et al. (2020), investigaron el efecto terapéutico del complejo óxido de zinc-RES encapsulado en NPs-Q (NPs-QRZnO) contra la *diabetes mellitus* en ratas inducida por estreptozotocina. Se evaluaron NPs de un tamaño promedio de 38 nm con concentraciones de 100 a 500 μ g/mL. Se determinó que las NP en concentración de 500 μ g/mL tuvieron un efecto inhibitorio más alto sobre α-glucosidasa y la α-amilasa del 73 y del 78. 3 %, respectivamente, enzimas que actúan en la digestión de carbohidratos por lo que una manera de controlar la diabetes tipo 2 es interrumpir la actividad de ambas enzimas (Du et al., 2020).

1.1.7 Cultivo celular 2D y 3D

El cultivo celular es una herramienta ampliamente utilizada en la biología celular. Permite estudiar la morfología de las células, la acción de los fármacos, el desarrollo de la ingeniería de tejidos, el análisis de toxicidad y la expresión de genes o proteínas. Por lo que, juega un papel importante en el desarrollo de biofarmacéuticos. Además, presenta ventajas, como el uso de cultivos celulares homogéneos, reproducibilidad de los datos generados y la posibilidad de manipular genes y rutas moleculares (Ballav et al., 2022; Kapałczyńska et al., 2016; Segeritz and Vallier, 2017).

Hay dos tipos principales de cultivos celulares que se utilizan con mayor frecuencia: cultivo bidimensional (2D) y tridimensional (3D) (Ballav et al., 2022). El modelo 2D es el tipo de cultivo celular más utilizado, el cual se refiere al crecimiento de células en una superficie plana generando una monocapa. Este permite estudiar la actividad fisiológica y patológica de las células *in vitro*. Sin embargo, los resultados de los experimentos en 2D no son completamente consistentes y extrapolables con los experimentos *in vivo* obtenidos con animales y los experimentos clínicos (Sun et al., 2021). Por tanto, en los últimos diez años, se ha implementado los cultivos en 3D, un modelo más realista que proporciona a las células un ambiente de cultivo que se asemeje más al entorno *in vivo* (de León et al., 2020). Las estructuras 3D son multifuncionales y mecánicamente robustas. Por lo tanto, ofrecen el tipo de sustrato adecuado para el crecimiento de las CMM y adipocitos, además de replicar el entorno fisiológico específico de las células durante el cultivo (**Figura 8**) (Câmara et al., 2020).



Figura 8. Comparación del cultivo celular 2D y 3D. A) Las células cultivadas en 2D demuestran un comportamiento y restricciones ambientales. B) Las células cultivadas en 3D presentan una mayor complejidad para simular con mayor fidelidad el entorno *in vivo*. Modificado por Câmara et al., 2020.

Por ejemplo, Barros et al. (2018) evaluaron el efecto terapéutico y el potencial sinérgico de las combinaciones de fármacos doxorrubicina:resveratrol (DOX:RES) (en proporciones molares que oscilan entre 5:1 y 1:5) en cultivos celulares 2D y 3D de cáncer de páncreas. En esos estudios se demostró que el efecto sinérgico de esta combinación de fármacos era diferente en cultivos celulares 2D y 3D. En general, los resultados obtenidos revelaron que la combinación DOX:RES es prometedora para el tratamiento del cáncer de páncreas y corroboran la necesidad emergente de evaluar combinaciones de fármacos en cultivos celulares 3D (Barros et al., 2018).

La falta de medicamentos contra la obesidad y los efectos adversos producidos por estos, han generado la búsqueda de nuevas estrategias como recurrir a productos de origen natural. La investigación es desafiante pues aún no sean evaluado por completo estos compuestos a pesar de su gran uso como medicina tradicional. Es necesario mejorar y proteger sus propiedades mediante la nanotecnología y evaluar los efectos biológicos en ensayos *in vitro, in vivo* y *ex vivo* para garantizar su seguridad. También es fundamental la investigación sobre adipocitos para estudiar los procesos celulares y generar tratamientos positivos contra la obesidad. Por estos motivos en la presente investigación se decidió trabajar con un modelo esferoidal (3D) de adipocitos. Estructura que logra imitar el ambiente celular *in vivo* para comprender mejor los mecanismos que participan en el desarrollo de enfermedades metabólicas.

1.2 Hipótesis

Las nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol (NP-QR) disminuyen la viabilidad de preadipocitos cultivados en modelos celulares: monocapa (2D) y esferoidal (3D) en mayor medida que el RES no encapsulado.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Comparar el efecto en la viabilidad de preadipocitos cultivados en monocapa (2D) y esferoides (3D), expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol.

1.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol.
- Caracterizar en tamaño, forma y carga superficial de las nanopartículas cargadas con resveratrol.
- Determinar la cantidad de resveratrol encapsulado en las nanopartículas de quitosano y su cinética de liberación en condiciones fisiológicas.
- Comparar el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol en la viabilidad celular de adipocitos cultivados en 2D y 3D.

2.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol

Para la síntesis de nanopartículas de quitosano conteniendo resveratrol (NP-QR) y NP-QR tratadas con lisina (NP-QRL) se prepararon partiendo de una disolución de quitosano (Sigma-Aldrich, C3646) 0.25% (p/v) en agua ultrapura (tipo I) y con 2% (v/v) de ácido acético glacial (Fermont, 03011). La solución se agitó a 800 rpm durante 24 h a 25°C. La solución se centrifugó a 8000 x g por 15 min a 4°C (rotor JA14 Beckman) y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 11,000 x g por 20 min a 4°C con el mismo rotor. Seguido, el sobrenadante se ajustó a pH 4.5 con hidróxido de sodio 2 M (Macron Fine Chemicals, 7708-10) y se filtró sucesivamente a través de una serie de filtros con un tamaño de poro de 1.2 µm, 0.45 µm y 0.22 µm. Posteriormente, se vertieron 5 mL de quitosano a pH 4.5 en un vaso de precipitado. La mezcla se agitó durante 15 min a 800 rpm a 4°C utilizando un agitador magnético en una plancha de agitación.

Por otro lado, previamente se prepararon las siguientes soluciones: 1) Una disolución de RES (Sigma Aldrich, R5010) a 20,000 µg/mL. Se pesaron 10 mg de RES y se disolvió en 500 µL de etanol (Fermont, PQ06065). 2) Una disolución de glutaraldehído (Sigma Aldrich, G5882) 2.5% (v/v) disuelto en agua ultra pura (tipo I). 3) Una disolución de tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma Aldrich, 238503) a 2500 µg/mL. Se pesaron 2500 mg de TPP y se disolvieron en 10 mL agua ultra pura (tipo I). Esta disolución debe ser preparada en el momento de la síntesis de las NPs. Además, se filtró con una membrana con un tamaño de poro de 0.45 µm. 4) Una disolución de lisina (Sigma Aldrich, P4158) 2.5% (v/v) disuelta en agua ultra pura (tipo I).

Para la síntesis de NPs, se empleó un sistema automático de goteo (Poseidón) con velocidad de 0.09 mm/s de giro del motor. En la disolución de quitosano a pH 4.5 se agregaron 200 μ L de la disolución de RES y se mantuvo en agitación por 15 min a 800 rpm a 25°C. Enseguida, se agregó 1 mL de la disolución de TPP y se dejó 1 h a 800 rpm. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de la disolución de glutaraldehído a una velocidad de 0.09 mm/s y se dejó 1 h a 800 rpm. Finalmente, a la solución obtenida se le denominó nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol (**NPs-QR**). En un paso posterior, se agregaron 100 μ L de disolución de lisina con una jeringa de 1 mL en el sistema Poseidón y se dejó 1 h a 800 rpm a 25°C.

A la solución obtenida se le denominó como nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol tratadas con lisina (**NPs-QRL**).

La solución final se centrifugó a 8000 x g por 30 min a 4°C (rotor JA14 Beckman) y se recuperó el pellet. El pellet se resuspendió en agua ultra pura (tipo I) estéril y se centrifugó a 11,000 x g por 30 min. Una vez más, se volvió a obtener el pellet y se centrifugo nuevamente a 8000 x g por 30 min a 4°C. Finalmente, se recuperó el pellet como el sobrenadante para cuantificar la cantidad de resveratrol encapsulado en las NPs-QR y NPs-QRL.

2.1.1 Caracterización por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis)

El análisis de espectrofotometría UV-Vis del RES se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. Las mediciones se realizaron a partir de una solución de 6.7 mg/mL, de la cual se tomaron 50 µL y se disolvieron en 950 µL de agua ultra pura (tipo I). Ya que RES absorbe dos longitudes de onda 300 nm y 320 nm, se decidió obtener una curva patrón a 300 nm. La muestra fue disuelta en etanol de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se midió la absorbancia de 200 a 700 nm.

2.1.2 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta

El análisis del diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta de las NPs-Q, NPs-QR y NPs-QRL fue determinado por dispersión dinámica de luz (DLS) usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Para la preparación de las muestras se tomaron 200 μL de las NPs sintetizadas y se le agregaron 1300 μL de agua ultrapura (tipo I). Las NPs fueron analizadas por triplicado a 25°C usando una celda DTS1070.

2.1.3 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las NPs-Q y NPs-QR fueron evaluadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Hitachi, H7500, Japón), operado a 80 kV usando rejillas de cobre PELCO[®]. Se realizó una dilución de las NPs en agua ultrapura (tipo I) (1:20). Para teñir las muestras se agregaron 10 μL de muestra de las NPs sobre la rejilla, se dejó secar por 2 min 30 s, se secó el excedente con papel filtro, se agregaron 6 μL de

acetato de uranilo 4% en agua ultra pura (tipo I) v/v y se dejaron secar por 2.5 min, de igual manera quitando el excedente con papel filtro. Finalmente, se analizaron al TEM para verificar el tamaño y morfología de las NPs.

2.2 Cuantificación y optimización del encapsulado de resveratrol

2.2.1 Cuantificación del porcentaje de encapsulación

Para cuantificar el porcentaje de encapsulación (EE) de RES en las NPs-QR y NPs-QRL se realizó una curva de calibración con la cual se analizó la concentración de RES. Primero, se preparó una solución madre de RES (1000 µg/mL) a partir de la cual se realizó una disolución de trabajo (10 µg/mL) con la cual se prepararon diluciones seriadas (0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.16 µg/mL). Cada dilución fue medida por triplicado a 300 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. Finalmente, se empleó la curva de calibración previamente construida y la EE se determinó mediante la ecuación 1, donde Ci es concentración inicial y Cs es la concentración del sobrenadante.

$$EE = \frac{Ci \ de \ resveratrol - Cs \ de \ resveratrol}{Ci \ de \ resveratrol} \tag{1}$$

2.2.2 Optimización del porcentaje de encapsulación

La optimización se llevó a cabo realizando 5 síntesis con la metodología de la sección 2.1. Los vasos se enumeraron del 1 al 5, cada uno de ellos fue cargado con volúmenes diferentes de RES, se agregaron 200, 400, 600, 800 y 1000 200 µL, respectivamente. El procedimiento fue el mismo para todas las síntesis. El precipitado se colectó, así como el sobrenadante para posteriormente determinar el porcentaje de encapsulamiento.

Para determinar la EE, el sobrenadante de cada una de las concentraciones nuevas se midió mediante UV-Vis y se comparó con la curva de calibración previamente realizada.

2.2.3 Caracterización por DLS

El diámetro hidrodinámico de las NPs sintetizadas con diferentes volúmenes de RES (200, 400, 600, 800 y 1000 μ L) se evaluó mediante DLS usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Se tomaron 200 μ L de las NPs y se le agregaron 1300 μ L de agua ultra pura (tipo I). Las NPs fueron analizadas por triplicado a 25°C.

2.3 Liberación del resveratrol

2.3.1 Liberación de resveratrol en condiciones fisiológicas

Para determinar la liberación del RES en condiciones fisiológicas, las NPs fueron dializadas en una solución tampón de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) que se preparó de la siguiente manera: 8 g de cloruro de sodio (Fermont, 24902), 0.2 g de cloruro de potasio (Fermont, 24842), 1.44 g fosfato de sodio dibásico (Sigma Aldich, S3264) y 0.24 g de fosfato de potasio monobásico (Fermont, 35862) en 1 L de agua ultrapura (tipo I).

Posteriormente, para realizar las diálisis se trabajó con las NPs sintetizadas a pH 4.0 y 4.5. Se tomó 1 mL de NPs-QR por cada pH ajustando con ácido acético concentrado 99.8 %. Se colocaron 1000 µL de cada una de las soluciones en una membrana de diálisis y se introdujeron en 10 mL de la solución de PBS a pH 7.4 en agitación constante a 800 rpm durante 12 h a 25°C. Finalmente, la absorbancia se leyó cada 30 min a 300 nm.

2.3.2 Liberación de resveratrol en fluidos gastrointestinales simulados

También se realizaron pruebas de liberación en fluidos gastrointestinales simulados, que asemejan las condiciones de una parte del tracto gastrointestinal. Las diálisis se prepararon con base en la metodología de la sección 2.3.1, empleando NPs-QRL.

El fluido gástrico y fluido intestinal simulado se prepararon mezclando los diferentes constituyentes de electrolitos y enzimas, de acuerdo con la **Tabla 2**. Una vez obtenida la mezcla de fluido gástrico se ajustó

a pH 3 con ácido clorhídrico (HCl) (Sigma Aldrich, 84432) concentrado 37%, el fluido intestinal se ajustó a pH 7 con hidróxido de sodio (NaOH) 2M.

Fluido gástrico simulado		Fluido intestinal simulado	
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
	mmol/L		mmol/L
KCI	5.52	КСІ	5.52
KH ₂ PO ₄	0.72	KH ₂ PO ₄	0.72
NaHCO ₃	20	NaHCO₃	20
NaCl	37.76	NaCl	37.76
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.08	$MgCl_2(H_2O)_6$	0.08
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.4	NaOH	0.4
HCI	22.48	HCI	22.48
$CaCl_2(H_2O)_2$	0.07	$CaCl_2(H_2O)_2$	0.07
Lecitina	0.17		U/mL
	U/mL	Pancreatina	100
Pepsina	2000		mg/mL
		Extracto de bilis	6.25

Tabla 2. Constituyentes del fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado

KCl (Sigma Aldrich, P9541), NaHCO₃ (Fagalab, 2092), CaCl₂(H₂O)₂ (JT Baker,1313), Pepsina (Sigma Aldrich, P-7012), Pancreatina (Sigma Aldrich, P3292), KH₂PO₄ (Fermont, 35862), MgCl₂(H₂O)₆ (Fermont, 24842) y Extracto de bilis (Zimenton).

2.3.3 Punto isoeléctrico

La estabilidad de las NPs se determinó mediante el monitoereo del diámetro hidrodinámico y potencial zeta usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Las NPs-Q sintetizadas a diferentes pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.4 y 8.0) se prepararon con 200 µL de las NPs y se le añadieron 1300 µL de agua ultra pura (tipo I). Las NPs fueron analizadas mediante DLS por triplicado a 25°C. Se utilizó una celda DTS1070.

También se evaluó el diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las NPs-QRL en solución en los fluidos simulados. Para lo cual se tomaron 200 μ L del fluido gástrico simulado, se mezclaron con 20 μ L de NPs. La nueva mezcla se mantuvo en agitación e incubación a una temperatura de 37°C durante 4 h en una incubadora New Brunswick Scientific Series 25. Posteriormente, se monitoreo las NPs en intervalos de 30 min durante 4 h. Lo mismo se realizó con el sistema intestinal simulado.

2.4 Caracterización por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

2.4.1 Cuantificación del quitosano presente en las nanopartículas de quitosano

Para establecer la cantidad exacta de quitosano en las NPs sintetizadas se realizó la cuantificación de glucosamina mediante una hidrólisis ácida de quitosano por cromatografía líquida de alta eficiencia, (HPLC, por sus siglas en inglés) en un equipo Agilent 1100 series.

Se pesaron 10 mg de quitosano y se transfirieron a un matraz bola de 25 mL. Se agregaron 5 mL de H₂O y 5 mL de una mezcla de HCl/H₃PO₄ (3.75:1.25). El matraz se colocó a reflujo, bajo atmósfera de N₂ y se dejó reaccionar durante 1 h a 110°C para generar glucosamina. Transcurrida el tiempo, la reacción se dejó enfriar para después neutralizarla con NaOH 2 M. Posteriormente se aforó a 100 mL, para seguir con la derivatización y determinación de la glucosamina obtenida.

Para determinar el rendimiento del hidrolizado de glucosamina se realizó una curva patrón con clorhidrato de glucosamina (Sigma Aldrich, 1294207) (179.17 g/mol) la cual se derivatizó con benzaldehído (Sigma Aldrich, B1334) (106.12 g/mol = 1.05 g/mL) y cianoborohidruro de sodio (Sigma Aldrich, 156159) (62.84 g/mol = 1.2 g/mL), de acuerdo a los siguientes cálculos estequiométricos:

$$n = \frac{5x10^{-3}g}{179.17\frac{g}{mol}} = 2.79x10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 1\text{eq} = (2.79x10^{-5} \text{ mol})(106.12 \text{ mol}) = 2.9x10^{-3}\text{g}$$

$$\rightarrow \therefore V(\mu L) = \frac{2.9 \times 10^{-3} g}{1.05 g/mL} = 2.82 \times 10^{-3} mL = 2.82 \ \mu L \ de \ benzaldehi do$$

n =
$$\frac{5x10^{-3}g}{179.17\frac{g}{mol}}$$
 = 2.79x10⁻⁵ mol → 1eq = (2.79x10⁻⁵ mol)(62.84 mol) = 1.753x10⁻³ g

 $\rightarrow \therefore V(\mu L) = \frac{1.753 \times 10^{-3} g}{1.2 \text{ g/mL}} = 1.46 \times 10^{-3} \text{mL} = 2.82 \text{ }\mu L \text{ de cianoborohidruro de sodio}$

Se tomaron las cantidades necesarias de los reactivos y se dejaron reaccionar durante 2 h a 25°C, haciendo el seguimiento de la reacción por cromatografía de capa fina para corroborar que la reacción haya
finalizado. El procedimiento anterior se realizó para la glucosamina obtenida del hidrolizado del quitosano y para las nanopartículas de quitosano.

2.4.2 Determinación de glucosamina por HPLC

La separación y detección de los derivados de glucosamina se realizaron en un sistema de cromatografía líquida HPLC Agilent 1100 Series, que consta de una bomba binaria, y un detector de absorbancia. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el software Agilent. La separación de fase inversa se llevó a cabo en una columna Symmetry C18 (2.1 x 150 mm, 5 μ m, Waters Co.). Se utilizó una solución de H₂O como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B con el programa de gradiente mostrado en la **Tabla 3**. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 ° C y la detección se realizó a 248 nm.

Tiempo (min)	Eluyente A (H ₂ 0)	Eluyente B (CH ₃ CN)
0	90	10
3	90	10
6	80	20
9	50	50
12	20	80
15	10	90
20	10	90

Tabla 3. Gradiente de elución por HPLC para la determinación de glucosamina en quitosano.

2.5 Cultivo celular

Las líneas celulares AML-12 y 3T3-L1 se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, La línea celular AML-12 (alpha mouse liver 12) hepatocitos aislados del hígado normal de un ratón fue cultivada en cajas Petri de 6 cm. Se utilizó 5 mL de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB), 10 µg/mL de insulina, 5.5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenio, 40 ng/mL de dexametasona, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 1% v/v de L-glutamina y 1% v/v de antimicótico/antibiótico (penicilina y estreptomicina).

La línea celular 3T3-L1, preadipocitos derivados de células embrionarias de ratón comprometidas a diferenciarse en adipocitos se cultivaron en cajas Petri de 6 cm, se utilizó 5 mL de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium: High Glucose (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1.5 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 1% v/v de L-glutamina y 1% v/v de antimicótico/antibiótico (penicilina y estreptomicina).

Todos los reactivos de ambos medios se aforaron a un litro de agua ultra pura (tipo I), estéril y a pH 7.4. Las soluciones finales se esterilizaron mediante filtración con un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm.

2.5.1 Subcultivo o pase celular

Las líneas celulares AML-12 y 3T3-L1 se mantuvieron en crecimiento en cajas de Petri de 6 cm. Cuando las células adheridas tenían una confluencia del 80-90% de la superficie de la caja Petri, fue necesario despegarlas. Para ello, se removió el medio de cultivo, se lavaron con 2 mL de PBS estéril. La solución se ajustó a pH 7.4 y posteriormente se esterilizó en autoclave.

Después del lavado con PBS, se agregó 1 mL de una solución de tripsina/EDTA, se dejaron en incubación a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Para las células AML-12 son 3 min y para las 3T3-L1 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, las células que se despegaron de la caja Petri se colectaron en un tubo cónico de 1.5 mL, que se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. El sobrenadante se desechó con cuidado y el pellet celular fue resuspendido en 1 mL del medio correspondiente a la línea celular para eliminar cualquier residuo de tripsina, nuevamente se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. El sobrenadante se desechó y el pellet celular se resuspendió en 1 mL del medio correspondiente para cada línea celular.

Las células viables fueron contadas mediante tinción por exclusión de azul tripano con la ayuda de la cámara de Neubauer. Por último, se continuó con la expansión del cultivo celular, sembrando células en cajas Petri de 6 cm con 5 mL del medio correspondiente, se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, hasta que nuevamente las células adheridas obtengan la confluencia de 80-90%. Para preservar el cultivo celular de ambas líneas fue imprescindible mantener las células en congelación, por lo tanto, las células se congelaron y almacenaron a -80°C.

2.5.2 Conteo celular

El conteo celular se llevó a cabo por la técnica de exclusión de azul tripano, utilizando la cámara de Neubauer, una placa de vidrio esmerilado con dimensiones de 3 x 7 cm y 5 mm de grosor (**Figura 9**). Los cuadrantes 1,2,3 y 4 se utilizan para el conteo celular. El azul tripano es un compuesto que permite diferenciar entre células vivas y células muertas, cuando la membrana celular está dañada, permite el paso del colorante tiñendo a la célula de color azul, caso que no ocurre cuando la célula se encuentra viable. El procedimiento para el conteo celular se realiza de la siguiente manera: en un tubo cónico de 1.5 mL se agregan 40 μ L de azul tripano y 10 μ L de la suspensión celular, se mezclaron los 50 μ L de la solución de azul tripano con células y se tomaron 10 μ L de la muestra para después colocarse en la cámara de Neubauer, se observa la cámara de Neubauer con las células en un microscopio óptico. El conteo celular se determina mediante la ecuación 2, con la que se calcula el número de células por cada mililitro a través del conteo de las células viables en los cuatro cuadrantes de conteo de la cámara de Neubauer. En donde FD: es el factor de dilución, que en este caso fue de 5.

No. de células x mL =
$$\left(\frac{No. \ de \ células \ contadas}{4}\right) (FD) \left(\frac{10,000}{mL}\right)$$
 (2)



Figura 9. Esquema de la cámara de Nuebauer para el conteo celular.

2.5.3 Criopreservación celular

Las líneas celulares que han sido cultivadas, pueden almacenarse en congelación por largos periodos, para lo cual, se preparó medio de criopreservación que contiene 40% v/v del medio correspondiente para cada línea celular, 10% v/v de DMSO, y 50% v/v de SFB. Se tomaron alícuotas de la solución final tubos de criopreservación de 1 mL y se almacenaron a -20°C.

Cuando las células AML-12 y 3T3-L1 se encuentran en confluencia del 80-90%, se debe realizar un subcultivo celular para expandir el cultivo, pero también es importante preservarlo en congelación. Por ello una vez que se realizó el subcultivo de ambas líneas celulares, y dependiendo de la cantidad de células obtenidas, se tomó la decisión de expandir o congelar las células.

Al llegar a la confluencia requerida de ambas líneas celulares, se tripsinizaron, y se colocaron en un tubo cónico de 1.5 mL, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, el sobrenadante se desechó, se recuperó el pellet y se resuspendió en 1 mL de medio correspondiente para cada línea celular. Se centrifugó nuevamente a 1500 rpm por 5 min para quitar el remanente de tripsina. Después de centrifugar, se desechó el medio y las células se suspendieron en 1 mL de medio correspondiente para cada línea celular. Se realizó el conteo celular por exclusión de azul tripano. Posteriormente se sembraron las líneas celulares en cajas de 6 cm y otras fueron congeladas. A las células que no fueron sembradas, se les agregó 1 mL de medio correspondiente para cada línea de cultivo se desechó y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio de criopreservación. Las células fueron criopreservadas a -80°C. Se consideró 1 mL de medio de criopreservación para 1,000,000 de células.

2.5.4 Descongelamiento celular

Para el descongelamiento de las células se requirió incubar el tubo de criopreservación a 37°C y pasar las células a un tubo cónico de 1.5 mL, el cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Para quitar el remanente de medio de criopreservación, se le agregó 1 mL de medio de cultivo completo al pellet celular y nuevamente se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. El sobrenadante se desechó y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular. Posteriormente, se llevó a cabo el subcultivo y las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

2.6 Ensayo de viabilidad

2.6.1 Ensayo de visibilidad celular en un modelo de monocapa de células AML-12 y 3T3-L1 en por reducción de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT)

Para determinar si las NPs-Q, NPs-QR, NPs-QL, NPs-QRL y RES son citotóxicas a diferentes concentraciones se llevó a cabo el ensayo colorimétrico de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolde a (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol2-il)-1,3-difenilformazano (MTT), que consistió en cultivar 10,000 células AML-12 y 3T3-L1 por pozo en un volumen final de 100 µL de medio DMEM-F12. Transcurridas 24 h el medio se desechó y se agregaron las siguientes concentraciones de NPs-QR 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 µg/mL.

Después del lavado celular se les agregó a cada pozo 10 μ L de MTT y 90 μ L de DMEM. La placa de 96 pozos se incubó durante 4 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Al cabo de las 4 h a cada pozo se le agregó 100 μ L de isopropanol absoluto, con el fin de disolver los cristales de formazán. Se dejó actuar el isopropanol durante 30 min y enseguida se midió la absorbancia del formazán en las siguientes longitudes de onda: 570 y 690 nm en el lector de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan Go). El control negativo de este ensayo fueron células con 100 μ L de Tritón X-100 al 2% y control positivo fue células con medio DMEM-F12. Los ensayos de viabilidad se realizaron por triplicado atendiendo a las especificaciones del fabricante.

2.6.2 Crecimiento de esferoides

En una placa THERMO SCIENTIFIC nuclon sphera hecha en Japón de 96 pozos se sembraron 5,000 células 3T3-L1 por pozo en un volumen final de 100 μL de medio DMEM. Las células fueron incubadas por 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Transcurridas las 24 h, las células se observaron en el microscopio óptico y se determinó que las células se agregaban formando en promedio siete esferoides por pozo.

2.6.3 Ensayo de visibilidad celular en un modelo esferoidal de células 3T3-L1 por reducción de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para determinar si las NPs-QL, NPs-QRL y RES son citotóxicas a diferentes concentraciones en el modelo esferoidal (3D), se llevó a cabo el ensayo colorimétrico de reducción de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolde a (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol2-il)-1,3-difenilformazano, que consistió en sembrar 5,000 células 3T3-L1 por pozo en un volumen final de 100 µL de medio DMEM. Las células fueron incubadas por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Transcurridas las 24 h, el medio se desechó y se agregaron las siguientes concentraciones de NPs-QR 12.5, 25,50,75,100,125 µg/mL por triplicado a cada pozo que contenían las células. Las células con el tratamiento de NPs-QR se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. El control negativo de este ensayo fueron células con 100 µL de Tritón X-100 al 2% y el control positivo fue células con medio DMEM. Al terminar el periodo de incubación las NPs fueron retiradas de la placa de 96 pozos y cada pozo se lavó por duplicado con 100 µL de PBS. Posteriormente se realizó el mimo procedimiento que en el modelo en monocapa.

3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

3.1.1 Caracterización por TEM

De acuerdo con nuestros resultados en TEM, las nanopartículas de quitosano (NPs-Q) tienen una morfología esférica (**Figura 10A**) y una distribución de tamaño de 35 ± 10 nm (**Figura 10B**). De igual manera las NPs-QR tienen una morfología esférica; sin embargo, exhibieron un diámetro hidrodinámico mayor de 63 ± 33nm (**Figura 10C**). Como puede observarse a una menor amplificación de la imagen, se obtuvo una población de NPs de diversos tamaños, lo cual, correlaciona con nuestros datos en TEM (**Figura 10D**).



Figura 10. Caracterización fisicoquímica de las NPs-Q por TEM A) NPs aisladas y B) distribución de tamaño; y las NPs-QR C) aisladas y D) partículas de diversos tamaños.

3.1.2 Caracterización por DLS y potencial zeta

La dispersión dinámica de luz (DLS) se utilizó para determinar la distribución de tamaño obtenida mediante la medición del diámetro hidrodinámico. Las NPs-Q presentan un tamaño uniforme (298 ±65 nm) con un PDI de 0.272. Mientras que las NPs-QR mantuvieron un tamaño promedio similar (295 ±332 nm) con un PDI de 0.831 asociado a la presencia de una notable variación de tamaños. Por otro lado, las NPs-QRL presentaron dos picos de intensidad, en 418 y 769 nm, con un tamaño promedio de 944 ±98 nm y PDI de 0.761 (**Figura 11A**). Los tamaños de partícula son mayores a los obtenidos mediante TEM, debido a la tendencia de las NPs a aglomerarse cuando se encuentran en solución. Mediante la medición del potencial zeta, se determinó la carga superficial de las NPs, valor que está indica la estabilidad de las nanopartículas en suspensión. Las NPs-Q y NPs-QR presentaron un potencial zeta de 37 ±5 mV y 34 ±9 mV, respectivamente. Por otro lado, las NPs-QRL mostraron una estabilidad menor con un potencial zeta de 17 ±4 mV (**Figura 11B**).



Figura 11. Caracterización del radio hidrodinámico y el potencial zeta por DLS. A) Distribución del diámetro hidrodinámico de las NPs-Q (línea negra), NPs-QR (línea roja) y NPs-QRL (línea azul). B) Distribución de la carga superficial de las NPs-Q, NPs-QR y NPs-QRL.

3.1.3 Caracterización por DLS y potencial zeta

En la **Figura 12** se muestra el espectro de absorción UV-Vis del RES. El RES presenta bandas de absorción máximas en 300 y 320 nm que corresponden a los grupos cromóforos en su estructura.



Figura 12. Espectro de absorción UV-Vis del RES no encapsulado. A la derecha se muestra su estructura química.

3.2 Optimización de las características de las nanopartículas

3.2.1 Porcentaje de encapsulación de resveratrol

En la **Figura 13** se muestra la curva de calibración de RES que se realizó con concentraciones de 10, 13, 25, 50, 100, 150 y 167 μ g/mL las cuales se les asocio valores de absorbancia de 0.04, 0.06, 0.10, 0.19, 0.33, 0.44 y 0.47 respectivamente.

Posteriormente, la curva de calibración fue empleada para las mediciones de porcentaje de RES encapsulado en las NPs.



Figura 13. Curva de calibración de RES. Las mediciones se realizaron por triplicado y los puntos indican los valores promedios con sus desviaciones estándar (se obtuvieron valores pequeños en relación con la escala). El grafico se asoció a una línea recta con ecuación y = 0.0028x + 0.0286 y coeficiente de correlación (R²) de 0.9916.

La ecuación 1 se utilizó para determinar la eficiencia de encapsulamiento del RES en las NPs. El EE se muestra en la **Tabla 4**, cada valor corresponde a la síntesis de NPs con variación en los volúmenes de RES (200, 400, 600, 800 y 1000 μ L). Al emplear el volumen más pequeño, se obtuvo un EE de 92%, mientras que, al emplear el mayor volumen, fue de 95%, mostrando una diferencia de tan solo un 3%. Debido a lo cual se continuó trabajando con volúmenes de 200 μ L para todas las síntesis de NPs.

Volumen de RES (μL)	Y (Abs)	X (µg/mL)	Concentración inicial (µg/mL)	Concentración del sobrenadante (µg/mL)	Concentración del pellet (μg/mL)	Porcentaje de encapsulación (%)
200	0.16	47	625	47	578	92%
400	0.19	58	1231	58	1173	95%
600	0.25	80	1791	80	1711	96%
800	0.36	120	2319	120	2199	95%
1000	0.4	134	2817	134	2683	95%

Tabla 4. Optimización del porcentaje de encapsulación de RES variando las concentraciones iniciales durante la síntesis de NPs. Las mediciones se realizaron por triplicado.

El tamaño de las nanopartículas de quitosano cargadas con diferentes volúmenes de RES se muestra en la **Figura 14**. El diámetro hidrodinámico fue de 342, 396, 342 y 531 nm asociado a las NPs-QR sintetizadas con volúmenes de 200, 400, 600 y 100 μL de RES, respectivamente.



Figura 14. Diámetro hidrodinámico de las NPs-QR sintetizadas con diferentes volúmenes de RES. 200 (línea roja), 400 (línea negra), 600 (línea azul) y 100 µL (línea verde).

3.2.2 Punto isoeléctrico de las nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol

También se determinó el punto isoeléctrico de las NPs-QR a diferentes pH. El punto donde la densidad de carga de las NPs es cero, es un parámetro crítico para explicar la eficacia del proceso de adsorción en relación con las interacciones electrostáticas entre el adsorbente y los materiales adsorbidos. Como se ilustra en la **Figura 15**, el valor del potencial zeta es 0 a pH 5.2. Las NPs en solución con valores de pH inferiores a pH 5.2 adquieren valores de potencial zeta positivos, mientras que en solución con valores de pH por encima de pH 5.2 generan potencial zeta negativos.



Figura 15. Estabilidad de las NPs-QR a diferentes pH. Cambio del potencial zeta en relación a las variaciones en el pH. Las mediciones se realizaron por triplicado y los puntos indican los valores promedios con sus desviaciones estándar.

3.2.3 Cuantificación de quitosano

En el esquema de la **Figura 16** se plantea el mecanismo de la derivatización de la glucosamina para obtener el compuesto 3-(benzilamino)-6-(hidroximetil) tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triol. Compuesto que absorbe a 248 nm.



Figura 16. Mecanismo de derivatización de la glucosamina (creada por la autora en ChemDraw).

En la Figura 17, se presenta la curva de calibración para la glucosamina realizada con concentraciones de 28, 56, 113, 225, 450 y 900 μg/mL, asociados a valores de área de 10955, 20811, 85673, 137281 y 208660, respectivamente. La curva se construyó para determinar la cantidad de quitosano presente en las NPs sintetizadas. La muestra de NPs se indica con un punto color naranja interceptado por dos líneas del mismo color. Utilizando la curva de calibración, se determinó que en las NPs existe una concentración de quitosano de 200 ±15 μg/mL.



Figura 17. Curva de calibración de la glucosamina por amidación reductiva. Cuantificación de glucosamina en las NPs-QR. Las mediciones se realizaron por triplicado y los puntos indican los valores promedios con su respectiva desviación estándar (se obtuvieron valores pequeños en relación con la escala). La grafica se asoció a una línea recta con ecuación y = 234.23x + 12161.25 y coeficiente de correlación (R^2) de 0.96.

3.3 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol

3.3.1 Liberación de resveratrol en solución PBS

En la Figura 18 se muestra la cinética de liberación del RES contenido en las NPs-QR sintetizadas a pH 4.0 y pH 4.5 en una solución de PBS a pH 7.4.



Figura 18. Cinéticas de liberación del RES. NPs-QR evaluadas a pH 4.0 (línea azul) y pH 4.5 (línea naranja). Las mediciones se realizaron por triplicado y los puntos indican los valores promedios con su desviación estándar (la dispersión de los datos es mínima o igual a cero por lo que no se observan las barras en los promedios).

3.3.2 Liberación de resveratrol en fluidos simulados

Para determinar la cantidad de RES que se libera en condiciones fisiológicas. Las NPs-QRL se colocaron en un fluido gástrico y un fluido intestinal simulado. Midiendo la absorbancia de las muestras, fue posible conocer la cantidad de RES liberado respecto al tiempo. Las cinéticas de ambos fluidos simulados se muestran en la **Figura 19**. Las NPs en PBS y fluido intestinal simulado mostraron un comportamiento similar, alcanzando una liberación de RES máxima de 33% y 29%, al cabo de 480 min cada uno respectivamente. Mientras que la máxima liberación de RES en fluido gástrico simulado se alcanzó a los 30 minutos y se mantuvo constante durante todo el tiempo del experimento.



Figura 19. Cinéticas de liberación de resveratrol en fluidos simulados. NPs-QRL evaluadas frente a PBS (línea azul), fluido gástrico (línea naranja) e intestinal simulado (línea gris). Las mediciones se realizaron por triplicado. Los puntos indican los valores promedios con su desviación estándar (la dispersión de los datos es mínima o igual a cero por lo que no se observan las barras en los promedios).



Figura 20. Evolución del diámetro hidrodinámico de las NPs-QRL frente al fluido simulado. Variación del tamaño de las NPs-QRL en A) fluido gástrico y C) fluido intestinal, respectivamente. Cambio del potencial zeta de las NPs-QRL en B) fluido gástrico y D) fluido intestinal, respectivamente. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los puntos indican los valores promedios con su desviación estándar.

En la **Figura 20** se muestra el promedio del diámetro hidrodinámico y el cambio en el potencial zeta respecto al tiempo de las NPs en los fluidos gástrico e intestinal simulados. Las NPs en fluido gástrico presentaron tamaños promedio de 274 nm y 381 nm al tiempo de 0 y 270 min respectivamente (**Figura 20A**). Mientras que las NPs en fluido intestinal en el mismo intervalo de tiempo, mostraron una variación de tamaños de los 740 a 1136 nm (**Figura 20C**). Por otro lado, las NPs en fluido gástrico presentaron un potencial zeta positivo y estable (**Figura 20B**). Lo que contrasta con NPs en fluido intestinal donde muestran un potencial zeta negativo con tendencia variable en los primeros 120 min.

3.4 Viabilidad celular

Se determinó el efecto de la presencia de NPs-Q, NPs-QL, NPs-QR, NPs-QRL y RES en cultivos celulares. La posible citotoxicidad de las diferentes preparaciones de NPs se determinó evaluando la viabilidad celular. El ensayo se emplea para correlacionar la respuesta celular como el daño celular y/o a la alteración de los procesos fisiológicos al exponer las células a diferentes concentraciones de NPs. Hay varios tipos de ensayos que se pueden utilizar para determinarla viabilidad de las células. Uno de ellos es el ensayo de viabilidad por MTT, el cual se emplea como indicador de la actividad metabólica de las células y es cuantificable a través de colorimetría.



Figura 21. Evaluación de la viabilidad celular de las células de hígado (AML-12) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de RES (línea azul), NPs-Q (línea negra), NPs-QL (línea naranja), NPs-QR (línea roja) y NPs-QRL (línea morada). Los puntos indican los valores promedios con su desviación estándar.

Primeramente, la citotoxicidad de las NPs se evaluó en la línea celular de hígado AML-12 durante 24 h (**Figura 21**). Las líneas de colores indican la viabilidad de las células AML-12 expuestas a NPs-QR y RES con concentraciones de 12.5, 25, 50, 75, 100 y 125 μ g/mL y las NPs-Q a concentraciones de 4, 9, 17, 26 y 34 μ g/mL. Mientras que para las NPs-QL y NPs-QRL a concentraciones de 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 μ g/mL. Se observó un decaimiento de la viabilidad celular conforme aumenta la concentración de las NPs y RES. Siendo notablemente más toxicas las NPs-Q y NPs-QL.

Las fotografías de la **Figura 22** representan los cambios morfológicos de las células AML-12 expuestas a los tres tratamientos con las NPs-QR, NPs-Q y RES libre. Las células con DMEM-F12 son el control negativo y las tratadas con TritonX100 el control positivo de muerte celular. Las células AML-12 expuestas a NPs-QR presentan un menor tamaño y una forma redondeada desde la concentración de 75 µg/ml en cambio las tratadas con NPs-Q mostraron un menor tamaño a partir de los 25 µg/ml en comparación al control. Por otro lado, las células AML-12 que fueron tratadas con RES mantienen la forma y tamaño similar al control hasta los 100 µg/ml.



Figura 22. Alteración en la morfología de las células AML-12 expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de RES NPs-Q y NPs-QR. Las concentraciones usadas se indican en la figura. La barra negra indica la escala de medición de 100 µm. Se cultivaron 10,000 células por pozo.

También, la citotoxicidad del RES, NPs-QL y NPs-QRL se evaluó en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1 durante 24 h con 10, 000 células por pozo (**Figura 23**). Se comparó el efecto de las NPs-QRL y RES a

concentraciones de 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 300 µg/mL y las NPs-QL a concentraciones de 4, 9, 17, 26, 34, 43, 52, 60, 69, 86 y 104 µg/mL. Se infiere que la viabilidad de las células 3T3-L1 expuestas a RES decae significativamente a partir de los 100 µg/mL y cuando son tratadas con NPS-QL la muerte de las células se registró en concentraciones bajas (26 µg/mL), sin embargo, al tratar las mismas células con NPs-QRL la viabilidad disminuye hasta un 60% desde los 100 µg/mL y se mantiene una meseta entre el 40-60%. La concentración-respuesta del RES y las NPS-QRL es similar entre la concentración de 100 µg/mL y los 300 µg/mL.



Figura 23. Evaluación de la viabilidad celular de preadipocitos (3T3-L1) en cultivo 2D expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de RES (línea azul), NPs-QL (línea negra) y NPs-QRL (línea roja). Las mediciones se realizaron por triplicado con una densidad de 10, 000 células por pozo, los puntos indican los valores promedios con su desviación estándar.

La citotoxicidad de las NPs-QL, NPs-QRL y RES se evaluó en cultivo celular 3D de preadipocitos 3T3-L1 durante 24 h con la misma densidad celular de los experimentos anteriores para cada tratamiento (**Figura 24**). Se comparó el efecto de las NPs-QRL y RES a concentraciones de 12.5, 25, 50, 75, 100 y 125 μg/mL y las NPs-QL a concentraciones de 4, 9, 17, 26, 34 y 43 μg/mL.

En la **figura 24**, la viabilidad de las células 3T3-L1 cultivadas en esferoide (3D) y expuesta a RES, NPs-QL y NPs-QRL muestran una tendencia similar en la reducción de la viabilidad y la cual se mantiene por arriba del 60% de células viables en todas las distintas concentraciones evaluadas.



Figura 24. Evaluación de la viabilidad celular de los preadipocitos (3T3-L1) en cultivos 3D expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de RES (línea azul), NPs-QL (línea negra) y NPs-QRL (línea roja). Las mediciones se realizaron por triplicado y los puntos indican los valores promedios con su desviación estándar.

Tabla 5. La mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) de las NP y RES libre para las líneas celulares AML-12 y 3T3-L1. ^aLos datos fueron analizados en una ecuación de decaimiento de primer orden (V = V₀ e^{-kx}) en donde la concentración inhibitoria 50 es IC₅₀ = ln 0.5/k. ^bLos datos fueron analizados en una correlación lineal.

Línea celular	NPs	IC₅₀ (µg/mL)	R ²
AML-12ª	RES	102.2 ±7	0.95
	NPs-Q	17.7 ±2	0.95
	NPs-QR	60.3 ±11	0.86
	NPs-QL	58 ±10	0.86
	NPs-QRL	135 ±18	0.89
3T3-L1ª 2D	RES	104.0 ±16	0.90
	NPs-QL	118 ±12	0.92
	NPs-QRL	112 ±13	0.92
3T3-L1 ^b 3D	RES	25 ±23	0.39
	NPs-QL	26 ±11	0.60
	NPs-QRL	71 ±16	0.60

La dispersión dinámica de luz o DLS por sus siglas en inglés (Dynamic Light Scattering) es una técnica empleada para determinar la distribución de tamaño de las partículas (polímeros, proteínas, coloides y nanopartículas) en solución o suspensión. Además de estudiar la estabilidad de las formulaciones y detectar la presencia de agregación o aglomeraciones (Raval et al., 2019). Las NPs-Q, NPs-QR y NPs-QRL presentaron diámetros hidrodinámicos promedio de 298 ±65 nm, 295 ±33 nm y 944 ±98 nm respectivamente. El tamaño obtenido se atribuye al método de síntesis, gelificación iónica donde se producen gotas pequeñas a partir de la mezcla del material de recubrimiento y el compuesto que se desea encapsular (Ortiz-Romero et al., 2021). También se sabe que el tamaño de las NPs depende en gran medida de la concentración inicial de quitosano, el grado de acetilación y polimerización (Khanmohammadi et al., 2015). Dado que cambia la viscosidad de la solución de quitosano, además de que al aumentar el grado de desacetilación se asume que existe un mayor grado de entrecruzamiento, pues los grupos amino dan como resultado una estructura más compacta. De tal manera que se obtienen NPs pequeñas cuando el peso molecular del quitosano es menor. Los agentes reticulantes como es el tripolifosfato (TPP) y glutaraldehído también intervienen en el tamaño de las NPs. El TPP forma una interacción iónica con el quitosano e interactúa electrostáticamente con el grupo NH_3^+ que se forma al disolver el quitosano en condiciones ácidas por el ácido acético, por lo que tiene una alta densidad de carga cruzada con el quitosano (Zhang et al., 2004). En cambio, el glutaraldehído forma una base de Schiff con el quitosano pues como agente reticulante tiene dos grupos carbonilo C=O que se unirán al grupo NH₂ del quitosano y la reacción formada es un enlace imina (C=N). Por estas condiciones, es que se obtienen NPs de promedio inferior 1000 nm además de que se obtienen NPs pequeñas. Al usar glutaraldehído se obtienen NPs estables pues el quitosano es inestable en condiciones ácidas como básicas (Alidha Rahmani et al., 2022).

El potencial zeta es un parámetro empleado para determinar la carga superficial de las NPs en solución coloidal. El valor del potencial zeta se utiliza para comprender la estabilidad de las partículas a corto y largo plazo. En general, se acepta que el potencial zeta de las NPs en solución con valores de mayores a +25 mV o –25 mV suelen tener un alto grado de estabilidad. Mientas que valores de potencial zeta inferiores conducirán a una estabilidad física deficiente promoviendo la agregación, la coagulación o la floculación debido a la atracción entre fuerzas de van der Waals (Shnoudeh et al., 2019).

Cuando el pH de la suspensión aumentó por la adición de NaOH, el potencial zeta de la nanopartícula disminuyó abruptamente de +14.0 a -15.7 mV. Mientras que el punto isoeléctrico se encontró alrededor del pH 5.2 en donde la carga neta de las NPs es cero y por tanto se encuentra la menor estabilidad. Este comportamiento de las NPs fue previamente registrado por Nallamuthu (Nallamuthu et al., 2015). El cambio en el potencial zeta puede deberse a la adición del medio alcalino y, por tanto, las partículas tienden a adquirir cargas negativas por efecto de los grupos OH⁻. En general, la carga de las partículas es un factor determinante de la estabilidad y un potencial zeta de >+30 mV y <-30 mV es ideal para la estabilidad física de suspensión (Gumustas et al., 2017). El potencial zeta es muy sensible a los cambios que ocurren con la dilución, como las variaciones en el pH y la fuerza iónica. Por tanto, la medición en una solución diluida no puede reflejar el verdadero valor del potencial Zeta (Barhoum et al., 2018). Este fenómeno sucedió al modificar el pH de las NPs, la carga superficial cambió cuando las NPs se encontraban en un medio rico en H⁺, estas adquirían cargas positivas. Similar a lo que ocurre cuando se encuentran en un ambiente rico en OH⁻, la carga superficial de las NPs adquiere carga negativa. Es decir, que los grupos superficiales se ionizan dependiendo del pH que tenga la solución (Ramírez-García et al., 2018).

Las NPs-Q, NPs-QR y NPs-QRL presentaron valores de potencial zeta de 37 ±5, 34 ±9 y 17 ±4 mV respectivamente. Todas las NPs poseen carga superficial positiva debido a las condiciones ácidas de la solución ya que la estructura del quitosano está conformada por unidades repetidas de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, que están unidas por enlaces glucosídicos. Las unidades de D-glucosamina poseen grupos amino primarios que, por debajo de un pKa 6.5 se presenta una protonación de estos grupos, ya que el quitosano para aumentar su solubilidad se encuentra en condiciones ácidas por efecto del ácido acético. Además, la síntesis se llevó a cabo a pH de 4.5 en un ambiente rico de H⁺, esto se ve reflejado en una mayor carga superficial de las NPs (Aibani et al., 2021; Caprifico et al., 2022). Además, los valores de potencial zeta están lejanos a cero, lo que indica que las NPs son estables bajo estas condiciones.

Previamente, se ha reportado que NPs-Q con tamaño de partículas de 245 nm se debe a que las NPs alcanzan una conformación hinchada por las fuerzas repulsivas electrostáticas entre los grupos amino protonados y el exceso de TPP. El tamaño puede variar en consecuencia a que la protonación sea más fuerte o más baja de los grupos amino en la cadena de quitosano (Antoniou et al., 2015). El tamaño dependerá de los parámetros mencionados en caracterización por DLS. Sin embargo, las NPs tienen una forma casi esférica y una superficie lisa (Mohammadpour Dounighi et al., 2012). Esto se debe también al método de síntesis que es la gelificación iónica, técnica que se basa en la capacidad de los polielectrolitos para atravesar el enlace en presencia de contraiones para formar NPs. El quitosano que está en una solución ácida acuosa se le añade gota a gota con agitación continua una solución de TPP, formando un

complejo entre cargas opuestas, el quitosano sufre una gelificación iónica y precipita para formar partículas esféricas (Giri, 2016).

Es por ello que, las NPs sintetizadas presentan una morfología esférica. Las NPs-Q y NPs-QR presentan un tamaño promedio de 35 ±10 nm y de 63 ±33nm, respectivamente. Las NPs-QR tiene un tamaño mayor debido a que contienen RES, el cual queda atrapado en la red de quitosano. Los tamaños obtenidos por TEM contrastan con los obtenidos por DLS. Esto se atribuye a que, en las mediciones por DLS, las NPs se encuentran en solución lo que fomenta una mayor interacción entre las partículas, en la que intervienen interacciones electroestáticas.

El espectro UV-Vis del trans-resveratrol muestra un máximo a 304 nm y 321 nm (Camont et al., 2009; Deore & Bakliwal, 2019; Silva et al., 2013). Comparando los espectros previamente reportados con el obtenido, tenemos dos picos, uno en 300 nm y otro en 320 nm, estos valores de longitud máxima corresponden con los reportados. Además de que mediante las reglas de Woodward y Fieser se estimó la longitud máxima teórica para corroborar el espectro obtenido de manera experimental en esta investigación. Los valores aproximados obtenidos son semejantes a los registrados experimentalmente (**Tabla 6**).

	λ (300 nm)	λ (320 nm)
Base butadieno trans	214	214
Dos dobles enlaces adicionales a la base butadieno trans	60	60
Dos sustituyentes OH	12	12
Un sustituyente adicional al enlace trans	NA	5
Un sustituyente OH	NA	6
Total	286	297

Tabla 6. Cálculos teóricos de las longitudes de onda de absorción del espectro de UV-Vis del RES.

Al variar el porcentaje de encapsulamiento de RES se obtuvieron valores muy similares respecto al porcentaje de encapsulación inicial. De manera similar, con el tamaño promedio de las NPs (342 nm), se observan cinco gráficas correspondientes cada una al porcentaje de encapsulamiento resultado de los distintos volúmenes de resveratrol. En las cinco gráficas obtenidas del encapsulamiento de resveratrol, hay tres picos con la misma distribución de tamaño. El primero es inferior a 100 nm, el segundo aproximadamente en 250 nm y el tercero cercano a los 10,000 nm. La diferencia entre las cinco gráficas

es que todas tienen intensidades diferentes. Es decir, existen una mayor cantidad de NPs en algunas regiones del espectro, pero todas tienen el mismo comportamiento. Estos resultados garantizan que cuando se aumenta el volumen del resveratrol no existen grandes cambios en el porcentaje de encapsulamiento e incluso no afecta el tamaño promedio del diámetro hidrodinámico de las NPs. Por tanto, se puede concluir que las NP-Q logran encapsular por arriba del 90% de RES, sin importar si existe un exceso de éste.

El quitosano es un polisacárido aminado abundante en la naturaleza que consta de unidades lineales de glucosamina unida β -1,4 (GlcN) y N-acetilglucosamina (GlcNAc) (**Figura 25**). El quitosano exhibe distintas características estructurales al tiempo que varía el grado de desacetilación y el peso molecular (Li et al., 2013; Lizardi-Mendoza et al., 2016).



Figura 25. Estructura química del quitosano. Interpretación esquemática del estado policatiónico del quitosano (acetilación = 1/7) en soluciones acuosas ácidas. Modificado de Lizardi-Mendoza et al., 2016.

El proceso de desacetilación del quitosano implica la eliminación de los grupos acetilo de la cadena molecular del polímero, dejando un grupo amino expuesto (–NH₂) (Qinna et al., 2015). La desacetilación del quitosano normalmente varía del 50 al 95%, pero se puede obtener una desacetilación superior mediante pasos adicionales. El grado de desacetilación tiene una influencia crucial en las propiedades y funcionalidades del quitosano, como la cristalinidad, la rugosidad de la superficie, la hidrofobicidad, la viscosidad, la formación de películas, la capacidad de intercambio iónico, la solubilidad, como agente antibacteriano, reductor de lípidos, la degradación y la resistencia del material de las estructuras de quitosano (Li et al., 2013; Lv, 2016; Miao et al., 2020; Sukul et al., 2021). También, puede influir en la de células y unión con biomoléculas (Foster et al., 2015; Kiang et al., 2004).

El peso molecular es otro factor importante que determina las propiedades y funciones del quitosano (Ardean et al., 2021). La despolimerización es un proceso que convierte los polímeros (macromoléculas) en sus monómeros componentes (moléculas más pequeñas) (Flores, 2014). Se informó que un aumento en el peso molecular resultó en una mayor resistencia a la tracción de las membranas de quitosano, pero disminuyó la biodegradación del biopolímero (Rong Huei, 1996).

El conocer el grado de desacetilación y el peso molecular del quitosano es importante para cuantificar la cantidad de quitosano presente en las NPs y determinar los grupos amino libres que interactúan con los agentes reticulantes (TPP y glutaraldehído). Para cuantificar la cantidad de quitosano se realizó una hidrólisis total del quitosano en glucosamina monómero resultante de la desacetilación y despolimerización de este polímero.

La hidrolisis ácida consistió en una adición nucleofílica de parte del oxígeno que une a los dos monosacáridos a un hidrogenión logrando una protonación como se observa en la **figura 26**. obteniendo la glucosamina y la N-acetilglucosamina.



Figura 26. Mecanismo propuesto de despolimerización del quitosano (Creado por la autora en ChemDraw)

Una vez que se obtuvo el monómero de interés, se llevó a cabo una derivatización mediante una aminación reductiva, previó a esto se realizó una modificación estructural a glucosamina comercial para garantizar mediante HPLC que la hidrolisis ácida resultó y confirmar así la presencia de glucosamina a partir de quitosano, polímero con el que se realizó la síntesis de NPs.

La aminación reductiva consistió en la formación de la imina reduciendo el doble enlace con cianoborohidruro de sodio (**Figura 27**) para formar el compuesto 3-(benzilamino)-6- (hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triol que absorbe a 248 nm.



Figura 27. Mecanismo propuesto de desacetilación de N-acetilglucosamina (Creado por la autora en ChemDraw).

Para determinar la EE de las NPs-QR y NPs-QRL, se utilizó la curva de calibración antes descrita, y la ecuación 1 (Buosi et al., 2020). El RES de las NPs-QR sintetizadas se liberó de manera proporcional respecto al tiempo, y después de las 12 h de monitoreo la cantidad de RES se estabilizó. La liberación de RES en las NPs sintetizadas a pH 4.5 obtuvieron el mismo comportamiento, sin embargo, la cantidad de RES liberada fue menor.

Por otro lado, las NPs-QRL, en medio gástrico simulado, mostraron la mayor liberación de RES a los 30 min. Posteriormente se mantuvo estable. Este efecto se les atribuye a las cadenas de quitosano reticulado con TPP que en presencia de ácido se abren liberando el RES ya que el polianión interacciona con las cargas positivas del medio. Además, a un pH ácido, la atracción electrostática entre los grupos de amina protonada y las moléculas de H₂O es más significativa ayudando a disolver los polímeros de quitosano. Dando como resultado la erosión de la matriz de las NPs y la rápida liberación del fármaco. Las NPs se hincharon significativamente e incluso se disociaron rápidamente, lo que resultó en la liberación rápida del RES. La liberación del RES fue más rápida a un pH más bajo que a un pH neutro o más alto (Herdiana et al., 2022). Hecho que se comprueba con la liberación de RES en medio neutro, ya que la liberación fue lenta y gradual manteniéndose constante hasta el final del experimento. El RES se libera por difusión de la red de quitosano de las NPs formada por los agentes reticulantes.

Estos experimentos permitieron cuantificar la cantidad de RES en las NPs en un ambiente fisiológico, no obstante, la solución de PBS a pH 7.4 no emula las condiciones fisiológicas lo cual impide conocer el comportamiento de las NPs una vez que entran al organismo. Por tanto, se evaluó el cambio en el tamaño y el potencial zeta de las NPs en fluidos gastrointestinales simulados. El monitoreo del tamaño del diámetro hidrodinámico de las NPs en condiciones gastrointestinales se determinó mediante DLS. Esto para determinar si había cambios significativos en el tamaño de las NPs una vez que están en contacto con otros compuestos como: electrolitos, proteínas y enzimas. Cuando las NPs interactúan con proteínas en entornos biológicos, están rodeadas por una capa de biomoléculas, principalmente proteínas que se adsorben en la superficie. Esta capa rica en proteínas que se forma alrededor de las NPs se denomina corona proteica. Las interacciones consiguientes entre las NPs y las proteínas se rigen por las características de la corona (Kopac, 2021).

Las NPs en el fluido gástrico simulado no incrementaron significativamente en tamaño ya que transcurrida media hora solo hubo un aumento de 72 nm. Una vez que trascurría el tiempo, las NPs se mantuvieron constantes en su tamaño. Lo contrario sucedió con la NPs expuestas en el ambiente intestinal simulado, el tamaño incrementó de manera gradual respecto al tiempo manteniéndose constante a las 4 h de interaccionar con la mezcla. Esto posiblemente se deba a las interacciones electrodinámicas, electrostáticas e interacciones de puente de polímero (Nel et al., 2009) entre el quitosano y las proteínas involucradas en la mezcla de fluido gástrico intestinal simulado, aumentando el tamaño. Existen reportes que muestran que un nanomaterial hidrofóbico tiene mayoritariamente una mayor cantidad de proteínas adsorbidas que el hidrofílico. Por tanto, la corona de proteínas alrededor de las NPs hidrofóbicas puede causar aglomeración y una mayor opsonización (Nguyen & Lee, 2017). También juegan un papel importante las interacciones electrostáticas, es decir, las fuerzas de van der Waals, debido al alto contenido de agua en las soluciones de los sistemas simulados. La mezcla de los fluidos gastrointestinales simulados contiene una gran cantidad de electrólitos, además de que el pH también interviene en el porcentaje total de cargas con las NPs. Estos ensayos demostraron que las NPs al entrar al organismo

forman coronas proteicas y el tamaño dependerá de la naturaleza del medio en la que se encuentran. En el caso del fluido gástrico, el tamaño fue menor, probablemente a consecuencia de que las proteínas utilizadas (lecitina y pepsina) son de menor tamaño en comparación con las utilizadas para el fluido intestinal (Capjak et al., 2017).

En el fluido gástrico el potencial zeta aumentó 7 mV manteniéndose constante durante las 4 h, tiempo que duró el experimento. Se obtuvieron valores positivos en la fase gástrica esto se debe a que la solución tenía un pH de 3, por lo que existe un ambiente rico en H⁺ como consecuencia de que los grupos NH₂ del quitosano desacetilado se protonaron. En cambio, el sistema intestinal tenía un pH de 7.4, y que a pesar de que es neutro había una cantidad de grupos OH⁻ debido a los constituyentes de la mezcla dando como resultado valores negativos en la carga superficial. En resumen, con base en los resultados se concluyó que las cargas positivas y negativas reflejan la adsorción de proteínas cargadas ya sea positivas o negativas, es decir, que también influyó en ambos sistemas la formación de la corona proteica. Cabe destacar que, aunque la carga fue positiva en el fluido gástrico y negativa en el fluido intestinal las NPs se mantuvieron estables en ambos sistemas.

Las gráficas de la **Figura 21** reflejan la actividad metabólica celular como un indicador de la viabilidad celular y toxicidad del tratamiento (Ghasemi et al., 2021). Se comparó la viabilidad celular de las NPs-Q, NPs-QR, NPs-QL, NPs-QRL y RES utilizando seis concentraciones que van de 12.5, 25, 50, 75, 100 y 125 µg/mL para todos los tratamientos en la línea celular de hepatocitos AML-12. Las cinco gráficas (**Figura 21**) muestran un comportamiento similar de dosis respuesta. Sin embargo, las NPs-Q y NPs-QR mostraron ser más tóxicas en comparación con las NPs tratadas con lisina. Obteniendo la siguiente relación de acuerdo a la IC₅₀ NPs-Q<NPs-QRL y NPs-QL<NPs-QRL. La toxicidad de las NPs se le atribuye al remanente de glutaraldehído, por lo que como último paso de las síntesis de las NPs-Q y NPs-QR se trataron con lisina, disminuyendo la citotoxidad de las NPs. La Tabla 5 muestra la comparación del análisis estadístico de las IC₅₀ antes y después de ser tratadas con lisina. Las NPs expuestas a las células de hígado AML-12 alteraron su morfología. Las células AML-12 tienen un fenotipo poligonal plano con núcleos redondos y citoplasma granular (Schröder et al., 2022), como es posible observar en la **Figura 22**. Además, a partir de la concentración de 50 mg/mL de NPs, las células ya no presentan vesículas de grasa, indicando que las NPs inhiben la acumulación de grasa en células.

La **Figura 23** presenta las NPs-QL, NPs-QRL y el RES libre a diferentes concentraciones expuestas en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1. Se observó un decaimiento en la viabilidad conforme aumenta la

concentración de NPs. Es decir, a mayor concentración mayor citotoxicidad. Los tres tratamientos presentan el mismo comportamiento con IC_{50} muy similares (**Tabla 5**).

Los esferoides son agregados de células tridimensionales (3D) que reflejan mucho mejor la condición *in vivo* de los tejidos celulares (Waters & House, 2021). Por lo que, al comparar las IC₅₀ de los ensayos de viabilidad en células 3T3-L1 en cultivos 2D contra 3D, se obtuvieron valores cuatro veces mayor en cultivos 2D, por lo tanto, siendo menores en 3D, esto puede estar asociado a que los cultivos 3D representan una forma fácil y efectiva de reproducir una masa sólida e imitar las interacciones clave de los tejidos, obteniendo resultados más realistas y confiables (Bresciani et al., 2019). Aunado a lo anterior, un sistema esferoidal proporciona un entorno fisicoquímico *in vivo* al facilitar la interacción célula-célula y célula-matriz (Ryu et al., 2019).Entonces, la formulación de esferoides debe continuar estudiándose, ya que se obtienen resultados más reales y extrapolables a sistemas *in vivo* (Białkowska et al., 2020).

Capítulo 5. Conclusiones

Se logró sintetizar NPs-QR de un diámetro hidrodinámico de 295 \pm 332 nm con un potencial zeta de 37.5 \pm 5.05 mV mediante un sistema controlado de goteo obteniendo NPs estables y de morfología esférica.

Se optimizó el porcentaje de encapsulación de resveratrol en las NPs-QR sin variaciones significativas en el tamaño del radio hidrodinámico.

Se implementó un método analítico novedoso por HPLC acoplado a UV-Vis para determinar la cantidad de quitosano en las NPs-QR por hidrólisis ácida y aminación reductiva a partir de glucosamina.

La liberación de RES en condiciones fisiológicas fue gradual y proporcional respecto al tiempo, de acuerdo con los resultados del radio hidrodinámico y del potencial zeta de las NPs-QR en fluidos simulados gastrointestinales se mantienen estables y no hay diferencias en el tamaño.

De acuerdo a los ensayos de viabilidad celular por MTT en AML-12 y 3T3-L1 y a las IC₅₀ de NPs-Q, NPs-QR y RES se concluye que la citotoxicidad incrementa conforme aumenta la concentración en ambos modelos celulares. Los valores IC₅₀ fueron significativamente más altos en el modelo en monocapa que en esferoidal.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, la hipótesis planteada se acepta, debido a que las NPs-QR disminuyen la viabilidad celular al aumentar la concentración.

- Abdelsayed, G., Ali, D., Malone, A., Saidi, J., Myneni, M., Rajagopal, K., Cheema, F. H., and Hameed, A. (2022). 2D and 3D in-Vitro models for mimicking cardiac physiology. Applications in Engineering Science, 12, 100115. doi: 10.1016/j.apples.2022.100115
- Aguirre, L., Fernández-Quintela, A., Arias, N., and Portillo, M. (2014). Resveratrol: Anti-Obesity Mechanisms of Action. Molecules, 19(11), 18632–18655. doi: 10.3390/molecules191118632
- Aibani, N., Rai, R., Patel, P., Cuddihy, G., and Wasan, E. K. (2021). Chitosan Nanoparticles at the Biological Interface: Implications for Drug Delivery. Pharmaceutics, 13(10), 1686. doi: 10.3390/pharmaceutics13101686
- Alidha Rahmani, I., Mulyasuryani, A., and Andayani, U. (2022). Synthesis of Chitosan Magnetic Nanoparticles using Glutaraldehyde and Tripolyphosphate as Crosslinker. The Journal of Pure and Applied Chemistry Research, 11(2), 143–148. doi: 10.21776/ub.jpacr.2022.011.02.683
- Álvarez, V. (2012). Tratamiento farmacológico de la obesidad. Revista Médica Clínica Las Condes, 23(2), 173–179. doi: 10.1016/S0716-8640(12)70295-X
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., and Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 465, 137–146. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.10.040
- Ardean, C., Davidescu, C. M., Nemeş, N. S., Negrea, A., Ciopec, M., Duteanu, N., Negrea, P., Duda-Seiman, D., and Musta, V. (2021). Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. International Journal of Molecular Sciences, 22(14), 7449. doi: 10.3390/ijms22147449
- Ballav, S., Jaywant Deshmukh, A., Siddiqui, S., Aich, J., and Basu, S. (2022). Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Culture and Their Applications. doi: 10.5772/intechopen.100382
- Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Rahier, H., and van Assche, G. (2018). Physicochemical characterization of nanomaterials: polymorph, composition, wettability, and thermal stability. In Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-51254-1.00009-9
- Barros, A. S., Costa, E. C., Nunes, A. S., de Melo-Diogo, D., and Correia, I. J. (2018). Comparative study of the therapeutic effect of Doxorubicin and Resveratrol combination on 2D and 3D (spheroids) cell culture models. International Journal of Pharmaceutics, 551(1–2), 76–83. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.016
- Bauer, M. M. T. and Schnapp, G. (2007). Protein Production for Three-Dimensional Structural Analysis. In Comprehensive Medicinal Chemistry II. Elsevier. doi: 10.1016/B0-08-045044-X/00092-4
- Bhagat, S. and Singh, S. (2022). Cultivating human tissues and organs over lab-on-a-chip models: Recent progress and applications. doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.07.023

- Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., and Miłowska, K. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. International Journal of Molecular Sciences, 21(17), 6225. doi: 10.3390/ijms21176225
- Bilal, M. H., Alaneed, R., Steiner, J., Mäder, K., Pietzsch, M., and Kressler, J. (2019). Multiple grafting to enzymatically synthesized polyesters. doi: 10.1016/bs.mie.2019.04.031
- Bresciani, G., Hofland, L. J., Dogan, F., Giamas, G., Gagliano, T., and Zatelli, M. C. (2019). Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. Frontiers in Endocrinology, 10. doi: 10.3389/fendo.2019.00682
- Buosi, F. S., Alaimo, A., di Santo, M. C., Elías, F., García Liñares, G., Acebedo, S. L., Castañeda Cataña, M. A., Spagnuolo, C. C., Lizarraga, L., Martínez, K. D., and Pérez, O. E. (2020). Resveratrol encapsulation in high molecular weight chitosan-based nanogels for applications in ocular treatments: Impact on human ARPE-19 culture cells. International Journal of Biological Macromolecules, 165, 804–821. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.234
- Câmara, D., Shibli, J., Müller, E., De-Sá-Junior, P., Porcacchia, A., Blay, A., and Lizier, N. (2020). Adipose Tissue-Derived Stem Cells: The Biologic Basis and Future Directions for Tissue Engineering. Materials, 13(14), 3210. doi: 10.3390/ma13143210
- Camont, L., Cottart, C.-H., Rhayem, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, R., Collin, F., Beaudeux, J.-L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. Analytica Chimica Acta, 634(1), 121–128. doi: 10.1016/j.aca.2008.12.003
- Capjak, I., Goreta, S. Š., Jurašin, D. D., and Vrček, I. V. (2017). How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 68(4), 245–253. doi: 10.1515/aiht-2017-68-3054
- Caprifico, A. E., Foot, P. J. S., Polycarpou, E., and Calabrese, G. (2022). Advances in Chitosan-Based CRISPR/Cas9 Delivery Systems. Pharmaceutics, 14(9), 1840. doi: 10.3390/pharmaceutics14091840
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022, September 24). Health Effects of Overweight and Obesity. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Retrieved November 16, (2022), from https://www.cdc.gov/healthyweight/effects/index.html#print
- Chakarov, S., Blériot, C., and Ginhoux, F. (2022). Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. Journal of Experimental Medicine, 219(7). doi: 10.1084/jem.20211948
- Chang, X., Heene, E., Qiao, F., and Nick, P. (2011). The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in Vitis Cell. PLoS ONE, 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0026405
- Cheung, B. M. Y., Cheung, T. T., and Samaranayake, N. R. (2013). Safety of antiobesity drugs. Therapeutic Advances in Drug Safety, 4(4), 171–181. doi: 10.1177/2042098613489721
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., and Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. Frontiers in Endocrinology, 7. doi: 10.3389/fendo.2016.00030

- de León, S. E., Pupovac, A., and McArthur, S. L. (2020). Three-Dimensional (3D) cell culture monitoring: Opportunities and challenges for impedance spectroscopy. Biotechnology and Bioengineering, 117(4), 1230–1240. doi: 10.1002/bit.27270
- Deore, N. and Bakliwal, A. (2019). Optimization and Validation of Resveratrol Using Analytical UV Method Development. Journal Pharmaceutical Science and Research, 11. Retrieved November 17, (2022), from https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol11issue05/jpsr11051965.pdf
- Du, S., Lv, Y., Li, N., Huang, X., Liu, X., Li, H., Wang, C., and Jia, Y.-F. (2020). Biological investigations on therapeutic effect of chitosan encapsulated nano resveratrol against gestational diabetes mellitus rats induced by streptozotocin. Drug Delivery, 27(1), 953–963. doi: 10.1080/10717544.2020.1775722
- El-Alfy, E. A., El-Bisi, M. K., Taha, G. M., and Ibrahim, H. M. (2020). Preparation of biocompatible chitosan nanoparticles loaded by tetracycline, gentamycin and ciprofloxacin as novel drug delivery system for improvement the antibacterial properties of cellulose based fabrics. International Journal of Biological Macromolecules, 161, 1247–1260. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.118
- Eyring, M. B. and Martin, P. (2013). Spectroscopy in Forensic Science. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.05455-X
- Falke, S. and Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). doi: 10.1007/978-3-030-28247-9_6
- Filippatos, T. D., Derdemezis, C. S., Gazi, I. F., Nakou, E. S., Mikhailidis, D. P., and Elisaf, M. S. (2008). Orlistat-Associated Adverse Effects and Drug Interactions. Drug Safety, 31(1), 53–65. doi: 10.2165/00002018-200831010-00005
- Fischer-Posovszky, P., Kukulus, V., Tews, D., Unterkircher, T., Debatin, K.-M., Fulda, S., and Wabitsch, M. (2010). Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. The American Journal of Clinical Nutrition, 92(1), 5–15. doi: 10.3945/ajcn.2009.28435
- Fitzgerald, S. J., Janorkar, A. V., Barnes, A., and Maranon, R. O. (2018). A new approach to study the sex differences in adipose tissue. Journal of Biomedical Science, 25(1), 89. doi: 10.1186/s12929-018-0488-3
- Flores, R. M. (2014). Coalification, Gasification, and Gas Storage. In Coal and Coalbed Gas. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-396972-9.00004-5
- Foster, L. J. R., Ho, S., Hook, J., Basuki, M., and Marçal, H. (2015). Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. PLOS ONE, 10(8), e0135153. doi: 10.1371/journal.pone.0135153
- Freitas, L. and Almeida, E. (2017). Medicinal plants for the treatment of obesity: ethnopharmacological approach and chemical and biological studies. American Journal of Translational Research, 9(5), 2050–2064.
- Fruh, S. M. (2017). Obesity. Journal of the American Association of Nurse Practitioners, 29(S1), S3–S14. doi: 10.1002/2327-6924.12510
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., and Borras, C. (2015). Properties of Resveratrol: *In*

Vitro and *In Vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, (2015), 1–13. doi: 10.1155/2015/837042

- Gambini, J., López-Grueso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., el Alami, M., Bonet-Costa, V., Borrás, C., and Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. Revista Española de Geriatría y Gerontología, 48(2), 79–88. doi: 10.1016/j.regg.2012.04.007
- Geliebter, A., Astbury, N. M., Aviram-Friedman, R., Yahav, E., and Hashim, S. (2014). Skipping breakfast leads to weight loss but also elevated cholesterol compared with consuming daily breakfasts of oat porridge or frosted cornflakes in overweight individuals: a randomised controlled trial. Journal of Nutritional Science, 3, e56. doi: 10.1017/jns.2014.51
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., and Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. International Journal of Molecular Sciences, 22(23), 12827. doi: 10.3390/ijms222312827
- Giri, T. K. (2016). Nanoarchitectured Polysaccharide-Based Drug Carrier for Ocular Therapeutics. In Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-47347-7.00005-7
- González-Muniesa, P., Mártinez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., and Martinez, J. A. (2017). Obesity. Nature Reviews Disease Primers, 3(1), 17034. doi: 10.1038/nrdp.2017.34
- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., and Uslu, B. (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. In Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., and Muchtaridi, M. (2022). Drug release study of the chitosanbased nanoparticles. Heliyon, 8(1), e08674. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08674
- Holford, N. (2015). Clinical pharmacology = disease progression + drug action. British Journal of Clinical Pharmacology, 79(1), 18–27. doi: 10.1111/bcp.12170
- Imamura, H., Nagayama, D., Ishihara, N., Tanaka, S., Watanabe, R., Watanabe, Y., Sato, Y., Yamaguchi, T., Ban, N., Kawana, H., Ohira, M., Endo, K., Saiki, A., Shirai, K., and Tatsuno, I. (2017). Resveratrol attenuates triglyceride accumulation associated with upregulation of Sirt1 and lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. Molecular Genetics and Metabolism Reports, 12, 44–50. doi: 10.1016/j.ymgmr.2017.05.003
- Jensen, C. and Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? Frontiers in Molecular Biosciences, 7. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033
- Jeon, Y. O., Lee, J.-S., and Lee, H. G. (2016). Improving solubility, stability, and cellular uptake of resveratrol by nanoencapsulation with chitosan and γ-poly (glutamic acid). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 147, 224–233. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.07.062
- Joo, J. K. and Lee, K. S. (2014). Pharmacotherapy for Obesity. Journal of Menopausal Medicine, 20(3), 90. doi: 10.6118/jmm.2014.20.3.90

- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., and Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. Archives of Medical Science. doi: 10.5114/aoms.2016.63743
- Karimi, A., Majlesi, M., and Rafieian-Kopaei, M. (2015). Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. Journal of Nephropharmacology, 4(1), 27–30. Retrieved November 16, 2022, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297475/
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M., and Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 368(1927), 4439–4451. doi: 10.1098/rsta.2010.0175
- Kernan, W. N., Viscoli, C. M., Brass, L. M., Broderick, J. P., Brott, T., Feldmann, E., Morgenstern, L. B., Wilterdink, J. L., and Horwitz, R. I. (2000). Phenylpropanolamine and the Risk of Hemorrhagic Stroke. New England Journal of Medicine, 343(25), 1826–1832. doi: 10.1056/NEJM200012213432501
- Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H., and Ghasemi, K. (2015). Investigation of Size and Morphology of Chitosan Nanoparticles Used in Drug Delivery System Employing Chemometric Technique. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 14(3), 665–675.
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., and Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. Biomaterials, 25(22), 5293–5301. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.12.036
- Kojta, I., Chacińska, M., and Błachnio-Zabielska, A. (2020). Obesity, Bioactive Lipids, and Adipose Tissue Inflammation in Insulin Resistance. Nutrients, 12(5), 1305. doi: 10.3390/nu12051305
- Kopac, T. (2021). Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. International Journal of Biological Macromolecules, 169, 290–301. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108
- Koushki, M., Amiri-Dashatan, N., Ahmadi, N., Abbaszadeh, H.-A., and Rezaei-Tavirani, M. (2018). Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. Food Science & Nutrition, 6(8), 2473–2490. doi: 10.1002/fsn3.855
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., and Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8
- Kumari, A., Singla, R., Guliani, A., and Yadav, S. K. (2014). Nanoencapsulation for drug delivery. EXCLI Journal, 13, 265–286.
- Kwok, K. H. M., Lam, K. S. L., and Xu, A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. Experimental & Molecular Medicine, 48(3), e215–e215. doi: 10.1038/emm.2016.5
- Lee, M.-K., Lee, B., and Kim, C. Y. (2021). Natural Extracts That Stimulate Adipocyte Browning and Their Underlying Mechanisms. Antioxidants, 10(2), 308. doi: 10.3390/antiox10020308
- Leichner, C., Jelkmann, M., Prüfert, F., Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A. (2019). Intestinal enzyme delivery: Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles providing a targeted release behind the mucus gel

barrier. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 144, 125–131. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.09.012

- Li, B., Zhang, J., Bu, F., and Xia, W. (2013). Determination of chitosan with a modified acid hydrolysis and HPLC method. Carbohydrate Research, 366, 50–54. doi: 10.1016/j.carres.2012.11.005
- Li, M.-F. and Cheung, B. (2011). Rise and fall of anti-obesity drugs. World Journal of Diabetes, 2(2), 19. doi: 10.4239/wjd.v2.i2.19
- Li, S., Bouzar, C., Cottet-Rousselle, C., Zagotta, I., Lamarche, F., Wabitsch, M., Tokarska-Schlattner, M., Fischer-Posovszky, P., Schlattner, U., and Rousseau, D. (2016). Resveratrol inhibits lipogenesis of 3T3-L1 and SGBS cells by inhibition of insulin signaling and mitochondrial mass increase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1857(6), 643–652. doi: 10.1016/j.bbabio.2016.03.009
- Li, X., Zeng, D., Chen, L., Ke, P., Tian, Y., and Wang, G. (2021). Preparation and characterization of magnetic chitosan hydroxyapatite nanoparticles for protein drug delivery and antibacterial activity. Journal of Materials Research, 36(21), 4307–4316. doi: 10.1557/s43578-021-00424-x
- Lin, X. and Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Frontiers in Endocrinology, 12. doi: 10.3389/fendo.2021.706978
- Lizardi-Mendoza, J., Argüelles Monal, W. M., and Goycoolea Valencia, F. M. (2016). Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X
- Luo, L. and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. Journal of Endocrinology, 231(3), R77– R99. doi: 10.1530/JOE-16-0211
- Luque, C. A. and Rey, J. A. (2002). The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. European Journal of Pharmacology, 440(2–3), 119–128. doi: 10.1016/S0014-2999(02)01423-1
- Lv, S. H. (2016). High-performance superplasticizer based on chitosan. In Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-100214-8.00007-5
- Maleki, G., Woltering, E. J., and Mozafari, M. R. (2022). Applications of chitosan-based carrier as an encapsulating agent in food industry. Trends in Food Science & Technology, 120, 88–99. doi: 10.1016/j.tifs.2022.01.001
- Miao, Q., Cui, Y., Zhang, J., Mi, Y., Tan, W., Li, Q., Gu, G., Dong, F., and Guo, Z. (2020). Determination of chitosan content with ratio coefficient method and HPLC. International Journal of Biological Macromolecules, 164, 384–388. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.013
- Mohammadpour Dounighi, N., Eskandari, R., Avadi, M., Zolfagharian, H., Mir Mohammad Sadeghi, A., and Rezayat, M. (2012). Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 18(1), 44–52. doi: 10.1590/S1678-91992012000100006
- Moldoveanu, S. C. and David, V. (2017). Short Overviews of Analytical Techniques Not Containing an Independent Separation Step. In Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803684-6.00002-0

- Monika, B. S. P., Garg, R., and Sardana, S. (2017). Research Problems Associated with Resveratrol (trans-3, 5, 4'- trihydroxystilbene; RSV) and Various Strategies to Overcome those Problems (Review). Current Drug Delivery, 14(3), 364–376. doi: 10.2174/1567201814666161109115735
- Montan, P. D., Sourlas, A., Olivero, J., Silverio, D., Guzman, E., and Kosmas, C. E. (2019). Pharmacologic therapy of obesity: mechanisms of action and cardiometabolic effects. Annals of Translational Medicine, 7(16), 393–393. doi: 10.21037/atm.2019.07.27
- Mopuri, R. and Islam, Md. S. (2017). Medicinal plants and phytochemicals with anti-obesogenic potentials: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 89, 1442–1452. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.108
- Mujeeb, F., Bajpai, P., and Pathak, N. (2014). Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*. BioMed Research International, 2014, 1–11. doi: 10.1155/2014/497606
- Müller, T. D., Blüher, M., Tschöp, M. H., and DiMarchi, R. D. (2022). Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. Nature Reviews Drug Discovery, 21(3), 201–223. doi: 10.1038/s41573-021-00337-8
- Nallamuthu, I., Devi, A., and Khanum, F. (2015). Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 10(3), 203–211. doi: 10.1016/j.ajps.2014.09.005
- Nel, A. E., M\u00e4dler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. v., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nature Materials, 8(7), 543–557. doi: 10.1038/nmat2442
- Nguyen, V. H. and Lee, B.-J. (2017). Protein corona: a new approach for nanomedicine design. International Journal of Nanomedicine, Volume 12, 3137–3151. doi: 10.2147/IJN.S129300
- Novosad, S., Khan, S., Wolfe, B., and Khan, A. (2013). Role of Obesity in Asthma Control, the Obesity-Asthma Phenotype. Journal of Allergy, 2013, 1–9. doi: 10.1155/2013/538642
- Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., and Gallegos-Infante, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. TecnoLógicas, 24(52), e1962. doi: 10.22430/22565337.1962
- Padhi, S. and Behera, A. (2022). Biosynthesis of Silver Nanoparticles: Synthesis, mechanism, and characterization. In Agri-Waste and Microbes for Production of Sustainable Nanomaterials. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-823575-1.00008-1
- Parupudi, A., Mulagapati, S. H. R., and Subramony, J. A. (2022). Nanoparticle technologies: Recent state of the art and emerging opportunities. In Nanoparticle Therapeutics. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-820757-4.00009-0
- Patil, S., Pandit, A., Godbole, A., Dandekar, P., and Jain, R. (2021). Chitosan based co-processed excipient for improved tableting. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2, 100071. doi: 10.1016/j.carpta.2021.100071
- Periayah, M., Halim, A., and Saad, A. M. (2016). Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. Pharmacognosy Reviews, 10(19), 39. doi: 10.4103/0973-7847.176545

- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, , António J., and Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2(1), 8–21. doi: 10.1016/j.nano.2005.12.003
- Qinna, N., Karwi, Q., Al-Jbour, N., Al-Remawi, M., Alhussainy, T., Al-So'ud, K., Omari, M., and Badwan, A. (2015). Influence of Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Low Molecular Weight Chitosan on the Bioactivity of Oral Insulin Preparations. Marine Drugs, 13(4), 1710–1725. doi: 10.3390/md13041710
- Ramakrishnan, V. M. and Boyd, N. L. (2018). The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications. Tissue Engineering Part B: Reviews, 24(4), 289–299. doi: 10.1089/ten.teb.2017.0061
- Ramírez-García, G., Trapiella-Alfonso, L., d'Orlyé, F., and Varenne, A. (2018). Electrophoretic Methods for Characterizing Nanoparticles and Evaluating Their Bio-interactions for Their Further Use as Diagnostic, Imaging, or Therapeutic Tools. In Capillary Electromigration Separation Methods. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-809375-7.00019-8
- Ramírez-Garza, S., Laveriano-Santos, E., Marhuenda-Muñoz, M., Storniolo, C., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., and Lamuela-Raventós, R. (2018). Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. Nutrients, 10(12), 1892. doi: 10.3390/nu10121892
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., and Tekade, R. K. (2019).
 Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In Basic Fundamentals of Drug Delivery. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8
- Rayalam, S., Yang, J.-Y., Ambati, S., Della-Fera, M. A., and Baile, C. A. (2008). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Phytotherapy Research, 22(10), 1367–1371. doi: 10.1002/ptr.2503
- Reddy, N. L., Tan, B. K., Barber, T. M., and Randeva, H. S. (2014). Brown adipose tissue: endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. BMC Obesity, 1(1), 13. doi: 10.1186/s40608-014-0013-5
- Ritchie, H. and Roser, M. (2017). Obesity. Our World in Data. Retrieved November 16, (2022), from https://ourworldindata.org/obesity#citation
- Rodgers, A. and Sferruzzi-Perri, A. N. (2021). Developmental programming of offspring adipose tissue biology and obesity risk. International Journal of Obesity, 45(6), 1170–1192. doi: 10.1038/s41366-021-00790-w
- Rong Huei, C. (1996). Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. Carbohydrate Polymers, 29(4), 353–358. doi: 10.1016/S0144-8617(96)00007-0
- Ruban, A., Stoenchev, K., Ashrafian, H., and Teare, J. (2019). Current treatments for obesity. Clinical Medicine (London, England), 19(3), 205–212. doi: 10.7861/clinmedicine.19-3-205
- Ryu, N.-E., Lee, S.-H., and Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. Cells, 8(12), 1620. doi: 10.3390/cells8121620
- Saka, H. (2003). Transmission Electron Microscopy. In Carbon Alloys. Elsevier. doi: 10.1016/B978-008044163-4/50014-0
- Salari, N., Jafari, S., Darvishi, N., Valipour, E., Mohammadi, M., Mansouri, K., and Shohaimi, S. (2021). The best drug supplement for obesity treatment: a systematic review and network meta-analysis. Diabetology & Metabolic Syndrome, 13(1), 110. doi: 10.1186/s13098-021-00733-5
- Salehi, B., Mishra, A., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P., Martins, N., and Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. Biomedicines, 6(3), 91. doi: 10.3390/biomedicines6030091
- Sánchez-Ramos, M., Marquina-Bahena, S., Alvarez, L., Román-Guerrero, A., Bernabé-Antonio, A., and Cruz-Sosa, F. (2021). Phytochemical, Pharmacological, and Biotechnological Study of Ageratina pichinchensis: A Native Species of Mexico. Plants, 10(10), 2225. doi: 10.3390/plants10102225
- Schröder, S. K., Schüler, H. M., Petersen, K. v., Tesauro, C., Knudsen, B. R., Pedersen, F. S., Krus, F., Buhl, E. M., Roeb, E., Roderfeld, M., Borojevic, R., Almeida, J. L., and Weiskirchen, R. (2022). Genetic and Molecular Characterization of the Immortalized Murine Hepatic Stellate Cell Line GRX. Cells, 11(9), 1504. doi: 10.3390/cells11091504
- Segeritz, C.-P. and Vallier, L. (2017). Cell Culture. In Basic Science Methods for Clinical Researchers. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
- Sethi, J. K. and Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. Journal of Lipid Research, 48(6), 1253–1262. doi: 10.1194/jlr.R700005-JLR200
- Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W. M., Eid, A. H., Nasrallah, G. K., and Pintus, G. (2020). Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. International Journal of Molecular Sciences, 21(6), 2084. doi: 10.3390/ijms21062084
- Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., and Alkelany, S. Z. (2019). Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. In Biomaterials and Bionanotechnology. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9
- Sibuyi, N. R. S., Moabelo, K. L., Meyer, M., Onani, M. O., Dube, A., and Madiehe, A. M. (2019). Nanotechnology advances towards development of targeted-treatment for obesity. Journal of Nanobiotechnology, 17(1), 122. doi: 10.1186/s12951-019-0554-3
- Sigma Aldrich. n.d. Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT. Sigma Aldrich. Retrieved November 20, (2022), from https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technicaldocuments/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cellproliferation-kit-i-mtt
- Silva, C. G., Monteiro, J., Marques, R. R. N., Silva, A. M. T., Martínez, C., Canle L., M., and Faria, J. L. (2013). Photochemical and photocatalytic degradation of trans-resveratrol. Photochemical & Photobiological Sciences, 12(4), 638–644. doi: 10.1039/c2pp25239b

- Sniderman, A. D., Cianflone, K., Arner, P., Summers, L. K. M., and Frayn, K. N. (1998). The Adipocyte, Fatty Acid Trapping, and Atherogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 18(2), 147–151. doi: 10.1161/01.ATV.18.2.147
- Soltys, L., Olkhovyy, O., Tatarchuk, T., and Naushad, Mu. (2021). Green Synthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Principles of Green Chemistry and Raw Materials. Magnetochemistry, 7(11), 145. doi: 10.3390/magnetochemistry7110145
- Song, Z., Xiaoli, A., and Yang, F. (2018). Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. Nutrients, 10(10), 1383. doi: 10.3390/nu10101383
- Sonia, T. A. and Sharma, C. P. (2014). Experimental techniques involved in the development of oral insulin carriers. In Oral Delivery of Insulin. Elsevier. doi: 10.1533/9781908818683.169
- Sukul, M., Sahariah, P., Lauzon, H. L., Borges, J., Másson, M., Mano, J. F., Haugen, H. J., and Reseland, J. E. (2021). In vitro biological response of human osteoblasts in 3D chitosan sponges with controlled degree of deacetylation and molecular weight. Carbohydrate Polymers, 254, 117434. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117434
- Sultan, M. H., Moni, S. S., Madkhali, O. A., Bakkari, M. A., Alshahrani, S., Alqahtani, S. S., Alhakamy, N. A., Mohan, S., Ghazwani, M., Bukhary, H. A., Almoshari, Y., Salawi, A., and Alshamrani, M. (2022). Characterization of cisplatin-loaded chitosan nanoparticles and rituximab-linked surfaces as targetspecific injectable nano-formulations for combating cancer. Scientific Reports, 12(1), 468. doi: 10.1038/s41598-021-04427-w
- Sun, M., Liu, A., Yang, X., Gong, J., Yu, M., Yao, X., Wang, H., and He, Y. (2021). 3D Cell Culture—Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? Advanced NanoBiomed Research, 1(5), 2000066. doi: 10.1002/anbr.202000066
- Tabrizi, R., Tamtaji, O. R., Lankarani, K. B., Akbari, M., Dadgostar, E., Dabbaghmanesh, M. H., Kolahdooz, F., Shamshirian, A., Momen-Heravi, M., and Asemi, Z. (2020). The effects of resveratrol intake on weight loss: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(3), 375–390. doi: 10.1080/10408398.2018.1529654
- Tchang, B. G., Aras, M., Wu, A., Aronne, L. J., and Shukla, A. P. (2022). Long-term weight loss maintenance with obesity pharmacotherapy: A retrospective cohort study. Obesity Science & Practice, 8(3), 320– 327. doi: 10.1002/osp4.575
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., García-Conesa, M., and Espín, J. (2013). Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence. Current Pharmaceutical Design, 19(34), 6064–6093. doi: 10.2174/13816128113199990407
- Tomovska, R., Agirre, A., Veloso, A., and Leiza, J. R. (2014). Characterization Techniques for Polymeric Materials. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10910-2
- Vivek, R., Nipun Babu, V., Thangam, R., Subramanian, K. S., and Kannan, S. (2013). pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 111, 117–123. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.05.018

- Vivek, R., Thangam, R., Nipunbabu, V., Ponraj, T., and Kannan, S. (2014). Oxaliplatin-chitosan nanoparticles induced intrinsic apoptotic signaling pathway: A "smart" drug delivery system to breast cancer cell therapy. International Journal of Biological Macromolecules, 65, 289–297. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.054
- Waters, J. A. and House, C. D. (2021). Ovarian cancer stem cell biology and chemoresistance. In Overcoming Ovarian Cancer Chemoresistance. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-819840-7.00009-1
- Welz, A. N., Emberger-Klein, A., and Menrad, K. (2018). Why people use herbal medicine: insights from a focus-group study in Germany. BMC Complementary and Alternative Medicine, 18(1), 92. doi: 10.1186/s12906-018-2160-6
- Wharton, S., Lau, D. C. W., Vallis, M., Sharma, A. M., Biertho, L., Campbell-Scherer, D., Adamo, K., Alberga, A., Bell, R., Boulé, N., Boyling, E., Brown, J., Calam, B., Clarke, C., Crowshoe, L., Divalentino, D., Forhan, M., Freedhoff, Y., Gagner, M., Glazer, S., Grand, C., Green, M., Hahn, M., Hawa, R., Henderson, R., Hong, D., Hung, P., Janssen, I., Jacklin, K., Johnson-Stoklossa, C., Kemp, A., Kirk, S., Kuk, J., Langlois, M.-F., Lear, S., McInnes, A., Macklin, D., Naji, L., Manjoo, P., Morin, M.-P., Nerenberg, K., Patton, I., Pedersen, S., Pereira, L., Piccinini-Vallis, H., Poddar, M., Poirier, P., Prud'homme, D., Salas, X. R., Rueda-Clausen, C., Russell-Mayhew, S., Shiau, J., Sherifali, D., Sievenpiper, J., Sockalingam, S., Taylor, V., Toth, E., Twells, L., Tytus, R., Walji, S., Walker, L., and Wicklum, S. (2020). Obesity in adults: a clinical practice guideline. Canadian Medical Association Journal, 192(31), E875–E891. doi: 10.1503/cmaj.191707
- World Health Organization (WHO). (2021, June 9). Obesity and overweight. World Health Organization (WHO). Retrieved November 16, (2022), from https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-andoverweight#:~:text=Some%20recent%20WHO%20global%20estimates,%25%20of%20women)%20we re%20overweight.
- Zabel, R. A. and Morrell, J. J. (2020). Ultrastructural features of wood decay. In Wood Microbiology. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-819465-2.00009-7
- Zhang, H., Oh, M., Allen, C., and Kumacheva, E. (2004). Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery. Biomacromolecules, 5(6), 2461–2468. doi: 10.1021/bm0496211