



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS

“Estudio *in vitro* e *in vivo* del potencial de la miel de grado médico para su uso como viscoelástico en la articulación de rodilla”

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

M.C. Carlos Alejandro Martínez Armenta

Matrícula: **2192802058**

Co-director: **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Co-director: **Dr. Alberto Gabriel López Reyes**

Asesora: **Dra. Anell Olivos Meza**

JURADO

Presidente: **Dr. Julio César Almanza Pérez**

Secretario: **Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**

Vocal: **Dra. Gabriela Angélica Martínez Nava**

Vocal: **Dra. Maylin Almonte Becerril**

Ciudad de México, a 30 de junio de 2023

Declaración de originalidad

El que suscribe **Carlos Alejandro Martínez Armenta**, alumno del posgrado **Doctorado en Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Estudio *in vitro* e *in vivo* del potencial de la miel de grado médico para su uso como viscoelástico en la articulación de rodilla”**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de **Doctor en Biología Experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autorial y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el **30 de junio del 2023**.

Atentamente



Carlos Alejandro Martínez Armenta

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 332962

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

"Estudio *in vitro* e *in vivo* del potencial de la miel de grado médico para su uso como viscoelástico en la articulación de rodilla", que presentó

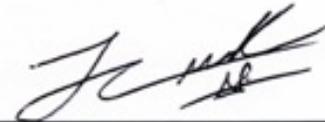
Carlos Alejandro Martínez Armenta

El día 30 de junio del año 2023.

Sinodales:

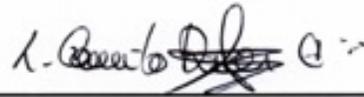
Dr. Julio César Almanza Pérez

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco



Dra. Gabriela Angélica Martínez Nava

Laboratorio de Gerociencias
Instituto Nacional de Rehabilitación LGII



Dra. Maylin Almonte Becerril

Dirección de Investigación y Posgrado, Universidad de la Salud
Ciudad de México – UNISA



Miembros del comité de tutores

Dr. Alberto Gabriel López Reyes

Co-Director

Laboratorio de Gerociencias

Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Co-Director

Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis

Departamento de Ciencias de la Salud, UAMi

Dra. Anell Olivos Meza

Asesora

Especialista en Ortopedia del Deporte y Artroscopía

Dedicatoria

El presente trabajo es dedicado a los pilares de mi vida.

Mis padres:

María de Jesús Armenta Rojas
Carlos Martínez León

Mis hermanos:

Alondra Guadalupe Martínez Armenta
León Francisco Martínez Armenta

Quienes siempre me han otorgado su apoyo incondicional
fortaleciéndome durante todos estos años lejos de casa.

Lugar de trabajo

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Gerociencias del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, México, bajo la co-dirección del Dr. Alberto Gabriel López Reyes y Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.

Este proyecto de tesis Doctoral fue posible gracias al apoyo de:

- Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México, financiamiento SECTEI/229/2021.
- Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatología, financiamiento otorgado en PANLAR Innovation Award 2021.

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” con número de registro 39/20.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Alberto López Reyes y Dr. Luis Gómez Quiroz por sus enseñanzas y consejos durante estos 4 años. Por brindarme la oportunidad de ser parte de sus grupos de trabajo, familia y alentarme en todo momento.

Al Dr. Carlos Pineda Villaseñor, Dr. Alberto López Reyes y Dra. Gabriela Martínez Nava por impulsarme en mi desarrollo científico y profesional.

Marlid, Alberto y Gabo. Agradezco por su constante apoyo y aliento durante todo este tiempo. Este viaje ha tenido sus desafíos, pero su disposición para escucharme y orientarme han sido fuente de fortaleza.

A la Dra. Carmen Camacho Rea por su apoyo incondicional durante mis estudios de Doctorado. No puedo dejar de mencionar tu generosidad; gracias por creer en mi potencial y brindarme la oportunidad de aprender a tu lado, incluso fuera del laboratorio.

Al Dr. Benjamín Leal Acevedo por su ayuda en el proceso de irradiación de la miel en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

A la Dra. Yolanda Moguel por su ayuda para obtener la miel de abeja en la zona de Yucatán y por su orientación para el resguardo correcto de la misma.

A Marisol Guzmán, Sergio Andrés Molina y Arturo Ortiz por todo el apoyo durante estos años de conocernos. Les estoy muy agradecido por la amistad que me han brindado, su calidez y sabiduría en los momentos más difíciles. Marisol, las incontables visitas a CDMX, charlas y salidas a cenar fueron muy alentadoras. Aún y cuando te despertaba con mis clases matutinas, siempre tenías una frase lista para olvidar el estrés y desvelo.

To Randolph Singh, Álvaro Santiago, and Spyros Pamfilos. I want to take a moment to express my deepest gratitude for the conversations, journeys, and adventures throughout these years. Every moment we have shared has been a treasure, enhancing our connection with emotions that words cannot entirely convey. Your unwavering support have stood as a pillar of strength, serving as a reminder that authentic friendship recognizes no boundaries. I'm thankful for the genuine connection we share.

A todos los involucrados en la culminación exitosa de esta tesis. Integrantes del Laboratorio de Ultrasonido Musculoesquelético y Articular, Bioterio, Laboratorio de Microscopía Electrónica, Servicio de Infectología y Laboratorio de Medicinal Experimental y Carcinogénesis.

Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a todos los integrantes del Laboratorio de Gerociencias por su invaluable apoyo y contribución durante el desarrollo de esta tesis. ¡Gracias por ser un equipo excepcional!

Resumen

La desregulación de la homeostasis del tejido articular induce cambios degenerativos articulares y enfermedades musculoesqueléticas como la osteoartritis. Esta patología representa la primera causa de discapacidad motora en personas mayores de 60 años, impactando en su calidad de vida y en los costos del sistema de salud. En la actualidad, los tratamientos farmacológicos para esta enfermedad no logran atenuar su progresión, dando como resultado una pérdida funcional de la articulación. En este sentido, nuestro trabajo de investigación se enfocó en generar una miel de grado médico, y determinar su inocuidad en un modelo *in vitro* de condrocitos humanos y en articulación de rata Wistar. Nuestros resultados demuestran que la miel de grado médico es inocua y que posee un elevado contenido de moléculas polifenólicas que confieren una alta actividad antioxidante. En el modelo *in vitro*, se observó un efecto citotóxico significativo a partir de la dosis 1% v/v en los esferoides de condrocitos humanos. Asimismo, hemos demostrado la inocuidad de la miel en articulación de rata Wistar después de 21 días de tratamiento vía intraarticular, 30 μ L / 1 dosis semanal. El análisis histológico demostró la ausencia de alteraciones en el cartílago femoral. De igual forma, mediante ecografía corroboramos la ausencia de inflamación en la cavidad articular y de cambios estructurales del cartílago hialino. Más aún, no se encontró evidencia de daño hepático, ni presencia de compuestos fenólicos en circulación al día 21 post tratamiento. En conclusión, hemos sentado las bases para continuar estudiando la viscosuplementación con miel de grado médico y así impactar en el proceso degenerativo articular provocado por el estrés biomecánico, inflamatorio y oxidante característicos de la osteoartritis.

Abstract

Dysregulation of joint tissue homeostasis induces articular degenerative changes and musculoskeletal diseases such as osteoarthritis. This pathology represents the first cause of motor disability in individuals over 60 years of age, impacting their quality of life and the costs of health systems. Nowadays, pharmacological treatments for osteoarthritis have failed to significantly inhibit disease progression, resulting in a functional loss of the joint. In this sense, our research focused on generating medical-grade honey and determining its safety in a 3D *in vitro* model of human chondrocytes and in Wistar rat joints. Our results show that medical-grade honey has a high content of polyphenolic molecules leading to increased antioxidant activity. Using the scaffold-free 3D culture system, we observed a greater proliferation of human chondrocyte spheroids at low doses and a significant cytotoxic effect starting from the 1% v/v dose. Moreover, we have demonstrated honey safety by its inoculation in Wistar rat joint. Any alterations in the femoral cartilage of rat joints were observed after 21 days of treatment by intra-articular administration (one dose, 30 μ L per week). The absence of inflammation in the joint cavity and structural changes in hyaline cartilage were demonstrated by ultrasound scan. Furthermore, no evidence of liver damage was found, nor the presence of phenolic compounds in circulation at day 21 post-treatment. In conclusion, we have laid the foundations to continue studying viscosupplementation with medical-grade honey to impact the degenerative joint process caused by inflammatory and oxidative stress in osteoarthritis.

Índice general

Miembros del jurado	III
Miembros del comité de tutores	IV
Dedicatoria	V
Lugar de trabajo	VI
Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract	X
Índice general	XI
Índice de Figuras y Tablas	XIV
Lista de Abreviaturas	XVI
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
1. Osteoartritis, principal causa de discapacidad motora en el adulto mayor	2
2. Fisiopatología molecular de la osteoartritis	2
3. Implicaciones de la inflamación en la degradación del cartílago articular	5
4. Implicaciones del estrés oxidante en la degradación del cartílago articular	6
5. Opciones terapéuticas para la OA	7
6. Efectos antiinflamatorios y antioxidantes de la miel	8
7. Potencial terapéutico de miel de grado médico en la regulación de la homeostasis articular	10

8. Moléculas bioactivas de la miel ejercen un efecto condroprotector	11
8.1 Actividad de los compuestos de la miel en la inflamación articular	13
8.2 Efecto de polifenoles en la actividad de enzimas degradadoras de la MEC	14
8.3 Efecto de los polifenoles sobre el estrés oxidante de condrocitos osteoartríticos	16
8.4 Efecto de compuestos bioactivos de la miel en la condroprotección	17
9. Miel en ingeniería de tejidos para la reparación del cartílago	18
10. Bioseguridad de la miel para aplicaciones clínicas	19
III. Justificación	21
IV. Hipótesis	23
V. Objetivo General	23
VI. Objetivos Particulares	23
VII. Materiales y Métodos	24
Obtención y purificación de miel	24
Generación de miel de grado médico	24
Fuente de irradiación	24
Almacenamiento de miel irradiada	25
Análisis microbiológico	25
Análisis multi-residual de plaguicidas	25
Evaluación de capacidad antioxidante	26
Potencial biológico de miel de grado médico en un modelo 3D de condrocitos humanos	29
Muestras de cartílago articular humano	29
Evaluación de los componentes de la MEC en muestras de cartílago articular	30
Aislamiento y cultivo primario de condrocitos humanos	30
Desdiferenciación de condrocitos humanos en cultivo en monocapa	31
Fabricación de moldes de agarosa	31
Generación de esferoides condrales	32
Ensayo de viabilidad celular	32
Evaluación morfométrica	33
Tinción de glucosaminoglicanos	33
Análisis de expresión génica	33
Esferoides tratados con miel de grado médico	35
Determinación de la inocuidad de la miel de grado médico en rodilla de rata	35
Tratamiento experimental	36
Ultrasonografía articular de rodilla	36
Preparación del tejido articular	36
Histología de la articulación de rodilla	37

Biodisponibilidad de moléculas bioactivas derivadas de la miel y hepatotoxicidad -----	38
Análisis de fenoles totales en suero-----	38
Histología de tejido hepático -----	38
Análisis estadístico -----	39
VIII. Resultados -----	41
Obtención de miel de grado médico -----	41
Descontaminación microbiológica mediante radiación gamma -----	42
Ausencia de plaguicidas en muestras de miel -----	43
Efecto de la radiación en las propiedades antioxidantes -----	45
Generación de un modelo 3D de condrocitos osteoartríticos humanos -----	48
Muestras de cartílago articular-----	48
Características antropométricas de los donantes de cartílago -----	48
Caracterización de marcadores de la MEC del cartílago de donantes -----	49
Morfología de los condrocitos articulares en cultivo primario -----	50
Regulación a la baja de genes condrogénicos en condrocitos cultivados-----	52
Desarrollo de esferoides libres de andamio-----	54
Efecto de la miel de grado médico en esferoides de condrocitos humanos -----	60
Inocuidad de la miel de grado médico en rodilla de rata Wistar -----	61
Estudios ecográficos -----	61
Evaluación macroscópica del cartílago articular de rata -----	62
Análisis histológico del cartílago articular de rata -----	63
Análisis de biodisponibilidad y efecto hepático de la miel de grado médico en rata Wistar -----	63
Compuestos bioactivos de la miel en suero-----	63
Micrografía de tejido hepático -----	63
IX. Discusión -----	65
X. Conclusiones -----	75
XI. Referencias -----	76
XII. Anexos -----	88
Artículo original -----	88
Artículo de revisión-----	90
Artículos en colaboración durante el Doctorado -----	92

Índice de Figuras y Tablas

Figura

1. Desregulación de la homeostasis articular en la OA.
2. Efecto condroprotector de los compuestos bioactivos presentes en la miel.
3. Recolección de miel de abeja *Melipona beecheii* y obtención de miel de grado médico.
4. Informe de plaguicidas multiresidual en miel emitido por Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes del SENASICA.
5. Capacidad antioxidante de la miel de grado médico.
6. Colocalización de SOX-9, ACAN, COL-1 y COL-2 en muestras de cartílago articular.
7. Caracterización del cultivo celular primario de condrocitos articulares.
8. Formación de esferoides libres de andamio a partir de condrocitos humanos.
9. Viabilidad de esferoides cultivados en condiciones de normoxia e hipoxia.
10. Características geométricas y producción de GAGs en esferoides estratificados por donador.
11. Expresión de genes condrogénicos en esferoides cultivados en condiciones de normoxia e hipoxia.
12. Actividad biológica de la miel de grado médico en esferoides cultivados en un ambiente hipóxico.
13. Ultrasonido en vista longitudinal de rodilla de rata Wistar infiltrada con miel de grado médico.

14. Inocuidad de la viscosuplementación con miel de grado médico vía intraarticular en rodilla de rata Wistar.

15. Análisis de biodisponibilidad de compuestos bioactivos de la miel y efecto hepático en ratas control y tratadas con miel de grado médico.

Tabla

1. Oligos usados para el análisis de expresión génica por qRT-PCR.
2. Parámetros para la radiación de miel con ^{60}Co .
3. Efecto de radiación gamma en la contaminación microbiológica de la miel.
4. Características antropométricas de los donadores de cartílago.

Lista de Abreviaturas

^{60}Co	Cobalto-60
ACAN	Agrecanos
AH	Ácido hialurónico
CAT	Capacidad antioxidante total
COL1A1	Colágena tipo 1 subunidad alfa
COL2A1	Colágena tipo 2 subunidad alfa
COX-2	Ciclooxigenasa-2
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FBS	Suero fetal bovino
GAG	Glicosaminoglicanos
HIF1 α	Factor inducible de hipoxia 1 alfa
HMGB1	Proteína cromosómica de caja de grupo de alta movilidad
IC	Intervalo de confianza
IF	Inmunofluorescencia
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
kGy	Kilogray
MEC	Matriz extracelular

mg EAA	Miligramos de equivalentes de ácido ascórbico
mg EAG	Miligramos de equivalentes de ácido gálico
mg EQ	Miligramos de equivalentes de quercetina
mg ER	Miligramos de equivalentes de rutina
MGM	Miel de grado médico
MIA	Iodoacetato monosódico
MMPs	Metaloproteasas
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartritis
PBS	Buffer de fosfatos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PGE2	Prostaglandina E2
RIC	Rango intercuartílico
RL	Radicales libres
RLCA	Reconstrucciones de ligamento cruzado anterior
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
TFG-β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

I. Introducción

La discapacidad en México representa un problema social y de salud pública importante, ya que casi 8 millones de habitantes padecen algún tipo de discapacidad, y de estos, el 49.9% son adultas mayores (1). La osteoartritis (OA) es la principal patología que genera discapacidad motora ocasionando diversos grados de discapacidad en el adulto mayor. A pesar de esto, hoy en día la medida terapéutica estándar para la OA es la corrección quirúrgica o el uso de terapias paliativas y/o biológicas, que representa una inversión considerable del Producto Interno Bruto (2). En este contexto, en la década de los 70's se detonó el uso terapéutico del ácido hialurónico (AH) en enfermedades musculoesqueléticas como la OA, ya que demostró funciones viscoelásticas (3) y actualmente tiene la intención de recuperar actividades biomecánicas y fisiológicas de la articulación. No obstante, su uso tiene aún limitaciones como su alto costo, la dosis adecuada y la frecuencia de administración (3, 4). Estas limitaciones han motivado a estudiar otros fluidos viscoelásticos que poseen características fisicoquímicas similares a las que presenta el AH y que, por su valor agregado de compuestos anti-inflamatorios, antioxidantes, analgésicos, senolíticos, antimicrobianos y cicatrizantes ofrezcan una mejor actividad biológica en la articulación.

II. Antecedentes

1. Osteoartritis, principal causa de discapacidad motora en el adulto mayor

La OA es una condición discapacitante que no tiene cura, caracterizada por una degeneración en la articulación inducida en gran medida por estrés metabólico y biomecánico (5). La OA es la principal causa de discapacidad en las personas mayores de 60 años, siendo más prevalente en mujeres (13%) que hombres (10%) (6, 7). En México, la incidencia de OA se estima en alrededor del 10.5%, y de estos, el 83.4% ha reportado un grado de limitación para realizar rutinas comunes debido a las condiciones incapacitantes (8, 9).

En nuestro país esta patología está aumentando de forma alarmante, en gran medida por la alta incidencia del sobrepeso y obesidad (9, 10); dado que estas condiciones promueven estados de desregulación metabólica e inflamación sistémica que contribuyen a la degeneración articular. Es importante mencionar que el sobrepeso y obesidad no son los únicos factores de riesgo para la OA, ya que los factores genéticos, la edad y género son condicionantes etiológicos importantes que contribuyen a su desarrollo (7, 8, 9).

2. Fisiopatología molecular de la osteoartritis

En la articulación de rodilla, el condrocito ejerce funciones anabólicas que ayudan a mantener un reemplazo adecuado de componentes específicos de la matriz extracelular (MEC) incluyendo fibras de colágena y proteoglicanos (11). El grado de deposición de las proteínas de la MEC es regulado por el factor inducible de hipoxia 1

alfa (HIF-1 α) el cual, en un microambiente con bajas concentraciones de oxígeno induce la expresión de SOX9, un regulador transcripcional maestro de la condrogénesis. La presencia de SOX9 promueve a su vez la expresión de genes condrogénicos tales como colágena tipo 2 (COL2A1) y agrecanos (ACAN), siendo estos los principales componentes de la MEC en el cartílago articular (12).

Es importante resaltar que, el envejecimiento del condrocito, así como agresiones biomecánicas al cartílago desencadenan un cambio metabólico del anabolismo al catabolismo (11). Por lo tanto, un estado catabólico altamente activo en el condrocito conllevará a la síntesis de mediadores inflamatorios y enzimas proteolíticas que perpetuarán la destrucción del cartílago y deteriorarán otros tejidos articulares incluyendo el hueso subcondral, membrana sinovial y meniscos (13). En este contexto, el número de condrocitos y su viabilidad se verá drásticamente afectada; más aún, la diferenciación del condrocito y generación de células hipertróficas se potenciará, conllevando en conjunto a una disminución en la calidad y síntesis de componentes de la MEC.

Por otro lado, el desbalance entre anabolismo y catabolismo generado durante la progresión de la OA puede ser contrarrestado por la expresión del factor de crecimiento transformante-beta (TFG- β), el cual modifica el desequilibrio de síntesis-reemplazo de proteoglicanos en la MEC (Figura 1) (14, 15). Adicionalmente, la actividad catabólica se asocia con una baja respuesta de los condrocitos a la estimulación por el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), disminuyendo así la producción de proteínas de la MEC y perpetuando la destrucción progresiva del cartílago (15, 16).

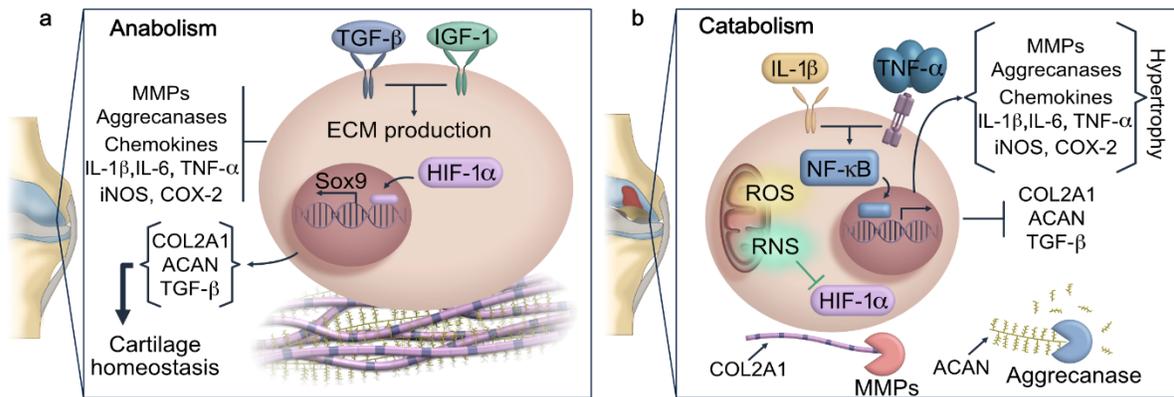


Figura 1. Desregulación de la homeostasis articular en la OA. (a) El anabolismo de la articulación regula la expresión génica y síntesis proteica de COL2A1 y ACAN en los condrocitos, manteniendo los componentes de la MEC del cartilago hialino con un recambio proteico regulado. (b) Se representa el desbalance homeostático en la articulación de rodilla, promovido por el estrés oxidante y ambiente inflamatorio. La señalización de IL-1β y TNF-α desencadena la regulación al alta de MMPs y agrecanasas provocando la degradación principalmente de COL2A1 y ACAN, considerados componentes clave de la MEC. ACAN: agrecano; COL2A1: colágena tipo II; MEC: matriz extracelular; HIF-1α: factor inducible por hipoxia 1 alfa; MMPs: metaloproteinasas; ROS: especies reactivas de oxígeno; RNS: especies reactivas del nitrógeno. Imagen adaptada de Martínez-Armenta C *et al.*, 2021.

En este sentido, la integridad comprometida del cartilago atenuará la función del resto de tejidos articulares fomentando la aparición de cambios morfoestructurales irreversibles como la formación de osteofitos, esclerosis subcondral, lesiones degenerativas en la región del menisco e hipertrofia de la membrana sinovial (17). Asimismo, la hipertrofia sinovial juega un papel fundamental en la perpetuación del estado inflamatorio ya que por su condición vascularizada condiciona la cantidad y calidad del líquido sinovial. Por lo tanto, la capacidad de lubricación de las articulaciones se verá afectada, provocando fricción y cizallamiento promotores de

estrés biomecánico y producción sostenida de citocinas pro-inflamatorias dentro de la articulación (17, 18).

3. Implicaciones de la inflamación en la degradación del cartílago articular

Los mediadores inflamatorios se consideran factores críticos para la destrucción del cartílago y sinovitis en la OA. Sin embargo, el estrés biomecánico, cirugía o traumatismos articulares también han sido reconocidos como agentes causales de una desregulación homeostática articular que promueven el inicio y progresión de la OA (19). En conjunto, todos estos factores inducen la generación de fibrocartílago y pérdida gradual de proteoglicanos y COL2A1 a causa de la alta producción de citocinas pro-inflamatorias. La señalización de estas citocinas estimulará un cambio en el fenotipo de los condrocitos, apoptosis y agravará la fibrosis sinovial (15, 20).

El estrés inflamatorio exacerbado en el espacio intraarticular activa la vía canónica del factor nuclear kappa B (NF- κ B) en los condrocitos y sinoviocitos. Una vez desencadenada su señalización celular, NF- κ B fomenta la expresión de diferentes genes incluyendo ciclooxigenasa-2 inducible (COX-2), citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas incluyendo la IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-15 e IL-18 que en conjunto mantendrán la inflamación articular (15). Asimismo, se promoverá la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y agrecanasas conllevando a la degradación de ACAN y fibras de colágenas presentes en el cartílago (20, 21). Más aún, dado la alta actividad enzimática en el cartílago articular, se incrementará la concentración de

productos derivados de la degradación de la MEC fomentando el catabolismo del condrocito y a su vez, una mayor destrucción del cartílago (21, 22, 23).

La liberación exacerbada de citocinas pro-inflamatorias en el ambiente articular inducirá una proliferación anormal de sinoviocitos y la infiltración de células inmunitarias en la membrana sinovial (24). Específicamente, se favorecerá la migración de macrófagos y neutrófilos, lo cual mantendrá la inflamación exacerbada dentro de la articulación. A nivel molecular, una alta concentración de IL-1 β y TNF- α en la cavidad articular puede activar los procesos catabólicos conllevando a la piroptosis de los sinoviocitos, lo cual ha sido asociado con grados severos de OA (25, 26, 27). Todos estos fenómenos en conjunto desencadenarán una regulación al alza de MMPs, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y una alta producción de óxido nítrico (NO) que acelerarán el desarrollo de la OA (21).

4. Implicaciones del estrés oxidante en la degradación del cartílago articular

Una actividad catabólica sostenida en el condrocito induce una sobre producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que inducen la hipertrofia del condrocito, disfunción mitocondrial y daño al DNA, proteínas y lípidos (28, 29). En este contexto, el estrés oxidante y altas concentraciones de ROS modificarán la síntesis de las proteínas de la MEC, así como su degradación mediante hidrólisis directa de las proteínas, promoviendo la expresión de MMPs generando condrocitos hipertróficos (Figura 1) (30); mientras que, la concentración de NO por encima del nivel basal ejercerá una reducción marcada en la señalización de HIF-1 α promoviendo la

hipertrofia del condrocito (31), al ser necesario para la expresión de SOX9 y afectando la señalización condrogénica.

5. Opciones terapéuticas para la OA

A pesar del gran impacto de la OA en los pacientes, las opciones terapéuticas y los estándares de atención son limitados. El manejo convencional de la OA incluye el control de peso y ejercicios físicos específicos como estrategias de intervención adyuvantes para la terapia farmacológica (32). Farmacológicamente, la primera línea de intervención incluye medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol para controlar el dolor crónico. Los inhibidores de la COX-2, los esteroides intraarticulares y la viscosuplementación también se consideran cuando falla el tratamiento estándar; sin embargo, su eficacia clínica es pobre en pacientes con comorbilidades (33). Por lo tanto, el uso de medicamentos para aliviar el dolor no representa una estrategia terapéutica para detener o revertir el daño del cartílago; dado que no son capaces de regular la homeostasis del cartílago articular, lo que hace que el cartílago sea propenso a sufrir más daños (34).

Hoy en día, el reemplazo articular y la viscosuplementación son los únicos enfoques terapéuticos disponibles con capacidad de observar un cambio en el estilo de vida de los pacientes con OA (17). La viscosuplementación con AH logra de alguna manera sustituir la pérdida de lubricación del cartílago, reduciendo la fricción dentro de las articulaciones, así como el estrés biomecánico asociado con la pérdida de cantidad y calidad del líquido sinovial (3, 4, 18). No obstante, diversas limitaciones en el uso del

AH han motivado el estudio de otros fluidos viscoelásticos para una terapia adyuvante que proporcione un mejor enfoque terapéutico para la OA.

Hoy en día, productos derivados de la colmena son utilizados para el manejo de diferentes enfermedades inflamatorias de las articulaciones como terapia no farmacológica. Bajo esquemas terapéuticos alternativos o adyuvantes, el potencial efecto biológico de la miel, el polen, el propóleo y el veneno de abeja se ha observado en humanos (35, 36), modelos murinos (37, 38) e *in vitro* (39, 40). Estos beneficios para la salud se observan principalmente cuando se utiliza miel de abeja sin aguijón, y sus beneficios para la salud se atribuyen a sus componentes bio-activos (41).

De acuerdo con datos publicados, diferentes compuestos bioactivos comúnmente observados en la miel tienen un papel efectivo en la disminución de lesiones intraarticulares al inhibir la inflamación, el estrés oxidante, la hiperplasia sinovial y la angiogénesis (42, 43, 44, 45, 46). Específicamente, la protección del cartílago y la mejora de las funciones reparadoras de los condrocitos inducidas por la miel, involucran diversas moléculas biológicamente activas que incluyen los flavonoides y compuestos fenólicos.

6. Efectos antiinflamatorios y antioxidantes de la miel

La miel es un líquido viscoso dulce, consumido por su valor nutritivo y sus efectos positivos en la salud. Se ha descrito la presencia de más de 200 compuestos químicos con actividades tan diversas como; antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, cicatrizante y senolítica (47). Entre las principales biomoléculas descritas en la miel se

encuentra el ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, crisina, quercetina, apigenina, galangina, kaemferol, luteolina y naringina, en donde su concentración dependerá del tipo de miel (48, 49, 50).

La miel ha sido usada desde tiempos ancestrales como un agente terapéutico para una gran variedad de condiciones clínicas. Su principal efectividad recae en su acción cicatrizante y antibacteriana, sin embargo, otros estudios han mostrado su efecto en cáncer, diabetes y dislipidemias (51, 52, 53, 54, 55).

El papel de la miel en el proceso inflamatorio ha sido reportado por diversos autores. Al-Wailli y colaboradores demostraron que el consumo de miel diluida disminuye la concentración de prostaglandina E₂, prostaglandina F₂ α y tromboxano B₂ en plasma de individuos sanos (56). En un estudio reciente, se ha mostrado el papel biológico de vesículas presentes en miel en un modelo de inflamación aguda hepática. Estas ejercen un potente efecto antiinflamatorio suprimiendo la activación del inflamasoma NLRP3 y la señalización de NF- κ B, siendo el miR-4057 la principal molécula responsable de dicha actividad (57).

Asimismo, otros estudios han explorado los efectos del consumo de miel sobre los niveles de malondialdehído y ROS en atletas, así como en modelos murinos sometidos a un régimen de ejercicio de alto impacto. Los autores demuestran que el consumo de miel conlleva a una reducción en los marcadores de daño oxidante característicos de una sobre activación metabólica mitocondrial durante periodos de actividad física intensa (58, 59).

Álvarez-Suárez *et al.* han teorizado que los componentes polifenólicos de la miel cruzan la membrana celular para neutralizar los radicales libres (RL) intracelulares y

promover la expresión de enzimas antioxidantes (60). La evidencia reunida por Gasparrini *et al.* demuestra que la miel de Manuka aumenta la expresión intracelular de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión s-transferasa en macrófagos, lo que respalda la teoría de Álvarez-Suárez (61); sin embargo, aún no se han dilucidado por completo los mecanismos de acción de la miel de Manuka sobre los neutrófilos y otros tipos de células relevantes.

Con base en los resultados de estudios preclínicos, la miel representa un candidato novedoso para controlar la progresión de la OA al contrarrestar el catabolismo en la articulación que posteriormente conllevará a la recuperación de la homeostasis articular.

7. Potencial terapéutico de miel de grado médico en la regulación de la homeostasis articular

Previas investigaciones han tenido como objetivo identificar los efectos antiinflamatorios de la miel de Manuka en macrófagos estimulados con LPS. Los resultados indican que la miel de Manuka aumenta la viabilidad celular al disminuir la apoptosis, inhibir la producción de RL y atenuar la inflamación. Estos efectos fueron regulados a nivel molecular por la disminución de las proteínas caspasa-3, p-p38 y p-Erk1/2. Además, se demostró un aumento de la respiración mitocondrial y la actividad glucolítica, lo que condujo a la expresión y estimulación de p-AMPK, SIRT1 y PGC1alpha (61, 62).

Por otro lado, un estudio *in vivo* demostró la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de la miel nigeriana en la artritis inducida por formaldehído en ratas Wistar. Este estudio reveló que la ingesta de miel redujo significativamente la inflamación de manera similar al tratamiento con indometacina durante una intervención de diez días (37). Además, se ha descrito el efecto benéfico que ejerce la miel y sus compuestos bioactivos derivados sobre la salud ósea (63). De igual forma, se ha descrito que los flavonoides presentes en la miel neutralizan los RL, lo que reduce la inflamación y minimiza el daño tisular (64).

En general, el potencial biológico de la miel previamente descrito se atribuye a los compuestos fenólicos como quercetina y ácido gálico, que también están presentes en altas concentraciones en diversos tipos de miel a nivel mundial (65). La eficacia de las moléculas bioactivas de la miel se ha explorado recientemente en la viabilidad de los condrocitos, la inflamación y la señalización del estrés oxidante.

8. Moléculas bioactivas de la miel ejercen un efecto condroprotector

El potencial condrogénico de los compuestos bioactivos de la miel se ha observado en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, lo que sugiere aplicaciones prometedoras de la miel como terapia adyuvante para modular la homeostasis del cartílago. Específicamente, mediante la inhibición de la inflamación y el estrés oxidante comúnmente observado en la OA (Figura 2).

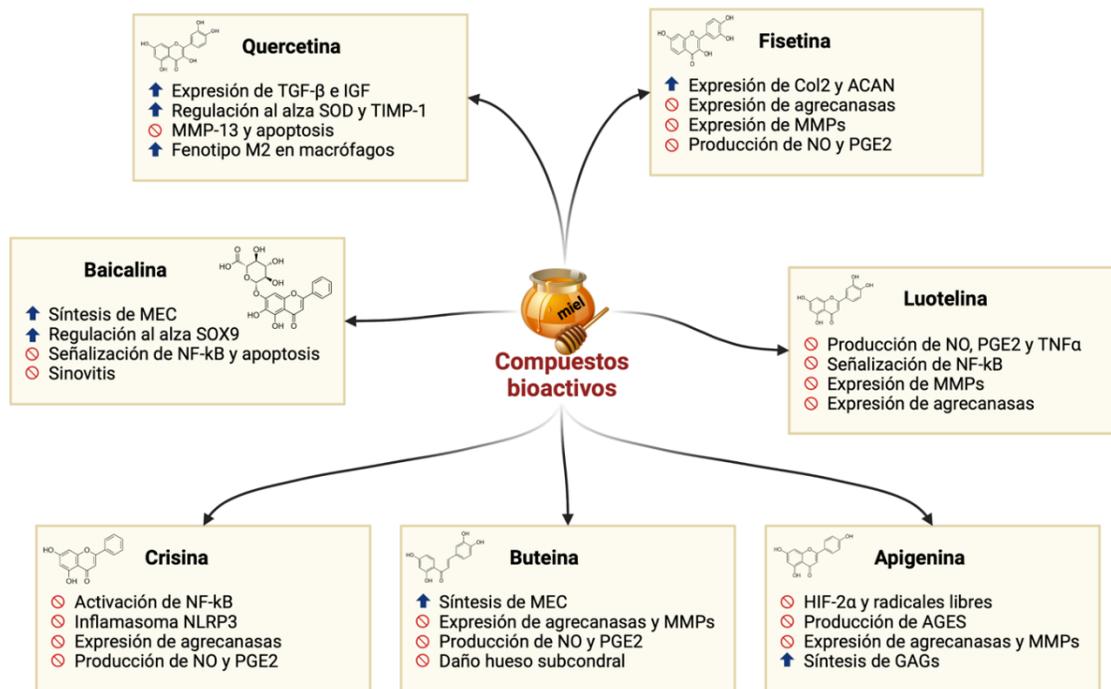


Figura 2. Efecto condroprotector de los compuestos bioactivos presentes en la miel. Mecanismos ejercidos por flavonoides derivados de la miel en modelos *in vitro* e *in vivo* de OA. Los diferentes flavonoides que se encuentran en la miel pueden modular el catabolismo en el tejido articular a través de diversas vías de señalización que promueven la expresión de genes relacionados con la condrogénesis, como *SOX9*, *ACAN* y *COL2A1*. ACAN: agregano; AGEs: productos finales de glicación avanzada; MEC: matriz extracelular; GAG: glicosaminoglicanos; HIF-2α: factor 2 alfa inducible por hipoxia; MMP: metaloproteinasas; NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2. ↑= regulación al alza, estimula o aumenta; ⊖= regulación negativa, inhibición, supresión o reducción. Imagen adaptada de Martínez-Armenta C *et al.*, 2021.

Aunque aún es limitada la información relacionada con los mecanismos de acción referentes a la homeostasis articular de cada flavonoide, ya se han investigado algunos de los procesos biológicos que subyacen a la inflamación articular, el estrés oxidante, la condroprotección y el metabolismo en el cartílago.

8.1 Actividad de los compuestos de la miel en la inflamación articular

Se ha demostrado que crisina, un flavonoide natural de la miel, atenúa la señalización del inflamasoma NLRP3, reduce la sinovitis, así como la liberación de IL-1 β , IL-18, sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina en un modelo de OA de rodilla inducida por iodoacetato monosódico (MIA) en ratas (66). Un segundo estudio *in vitro* ha demostrado que crisina bloquea drásticamente la degradación de I κ B- α estimulada por IL-1 β y la activación de NF- κ B usando condrocitos humanos estimulados con IL-1 β (67).

Adicionalmente, se ha documentado la actividad biológica de luteolina sobre la señalización de inflamación en condrocitos. Un estudio *in vitro* demostró que un pretratamiento con luteolina ejerce un bloqueo de la inflamación en condrocitos de rata mediante la inhibición de la producción de NO, PGE2 y TNF- α inducida por IL-1 β . Aunado a ello, luteolina redujo la fosforilación de NF- κ B regulando la actividad catabólica de los condrocitos al disminuir la expresión proteica de iNOS, COX-2, MMP-1, MMP-3 y MMP-13 (68).

Estudios en animales han demostrado la efectividad de luteolina para combatir la OA. La administración de luteolina por sonda (10 mg/kg/día durante 45 días) en un modelo de OA inducido por MIA mostró un efecto protector al atenuar la destrucción del cartílago articular y la progresión de la OA (68). En un segundo estudio se evaluó el efecto biológico de luteolina modulando la actividad catabólica de condrocitos derivados de un modelo de OA en cobayos. Como resultados se mostró que luteolina indujo una regulación negativa de JNK, p38 y MMP-13, y una baja producción de biomarcadores inflamatorios que incluyen NO, TNF- α e IL-6 (69).

Aunado a lo anterior, se ha documentado la eficacia de quercetina como molécula antiinflamatoria. Hu *et al.* demostraron que quercetina suprime la inflamación al modular la polarización de los macrófagos sinoviales al fenotipo M2 e inducir la expresión de factores de crecimiento como TGF- β e IGF, los cuales promueven la condrogénesis. El efecto condroprotector también se observó en modelos *in vivo*, utilizando la administración intraarticular de quercetina (70).

8.2 Efecto de polifenoles en la actividad de enzimas degradadoras de la MEC

Se ha descrito el papel de diferentes flavonoides en el mantenimiento de la síntesis de los componentes de la MEC en modelos de OA. El uso de crisina en un estudio *in vitro* mostró efectos favorables en condrocitos humanos estimulados con IL-1 β , sugiriendo que este flavonoide regula la expresión de MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 y ADAMTS-5, así como la degradación de ACAN y COL2A1 (67). Estos hallazgos están respaldados por una investigación reciente en la que crisina ejerció un efecto protector en condrocitos osteoartríticos humanos a través de la supresión de la proteína cromosómica de caja de grupo de alta movilidad (HMGB1). Asimismo, se demostró que crisina aumentó la expresión de COL2A1, mientras que inhibió la apoptosis celular y expresión de MMP-13 e IL-6 (71).

Por su parte, la fisetina y buteína ejercen un efecto antiinflamatorio y antioxidante al restaurar la expresión de COL2A1, ACAN y proteoglicanos en cultivos en monocapa de condrocitos. Fisetina y buteína han logrado regular la inflamación desencadenada por la IL-1 β en condrocitos mediante la inducción a la baja en la producción de NO y

PGE2, así como una inhibición significativa en la expresión de MMPs y agreganasas (72, 73). Estos efectos fueron corroborados en modelos *in vivo* de OA, mostrando una menor destrucción del cartílago y daño óseo subcondral cuando los ratones son tratados con buteína y fisetina mediante sonda intraperitoneal y oral, respectivamente (72, 73).

Luteolina ha mostrado un efecto potencial como molécula condroprotectora. Estudios *in vivo* e *in vitro* han documentado que luteolina inhibe la expresión génica y síntesis proteica de MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 y ADAMTS-5 en condrocitos articulares estimulados con IL-1 β . Para analizar el efecto directo de luteolina en la articulación, ratas Wistar fueron inoculadas de forma intraarticular con IL-1 β y luteolina (20 ng / 30 μ L); los resultados mostraron una inhibición marcada en la producción de MMP-3 en el cartílago hialino (74).

La apigenina es otro compuesto presente en la miel que puede desempeñar un papel esencial en la homeostasis del cartílago articular. Un estudio demostró que apigenina disminuye la expresión de MMP-13 en la línea celular SW1353 de condrocitos humanos tratados con IL-1 β a través de la inhibición de la señalización de c-FOS/AP-1 y JAK/STAT (75). Además, se ha reportado que apigenina puede inhibir la expresión de HIF-2 α , el cual es un regulador maestro de factores catabólicos como MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, IL-6 y COX (76). Recientemente, fue descrito por Park JS *et al.* un efecto antidegenerativo de apigenina en condrocitos de conejo; donde los autores mencionan que esta molécula regula la expresión génica de enzimas que degradan la MEC como MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 y ADAMTS-5. Además, observaron que la producción de MMP-3 fue inhibida en ratas tratadas con apigenina e IL-1 β (77).

8.3 Efecto de los polifenoles sobre el estrés oxidante de condrocitos osteoartríticos

En este contexto, dado que la desregulación de la NADasa (CD38) afecta la homeostasis de los condrocitos articulares al promover un estrés oxidante excesivo junto con una disminución significativa de la expresión de Sirtuin-1 (SIRT-1); es posible que algunos flavonoides como apigenina y quercetina puedan actuar como inhibidores de CD38. Adicionalmente, la producción de NO y la generación de superóxido mitocondrial se atenúa mediante el mantenimiento de la función de SIRT-1 y SIRT-3 en condrocitos humanos estimulados con IL-1 β (78, 79).

Se ha respaldado el papel biológico de crisina en la inhibición del estrés oxidante mediante el uso de condrocitos humanos tratados con IL-1 β . Zheng *et al.* observaron que crisina inhibe significativamente la producción de NO y PGE2 en condrocitos humanos pretratados con crisina y posteriormente, estimulados con IL-1 β . Adicionalmente, se demostró que este flavonoide reduce la expresión de COX-2 e iNOS en el mismo modelo *in vitro* (67).

Recientemente, un estudio describió el papel de quercetina promoviendo una actividad anabólica en condrocitos de rata estimulados con IL-1 β , así como un efecto anti apoptótico al inhibir la producción de ROS y el estrés del retículo endoplásmico a través de la activación de la vía de señalización SIRT1/AMPK (70, 80). Un segundo reporte mostró que la administración de quercetina por sonda (25 mg kg⁻¹) en conejos con OA de rodilla reguló positivamente la superóxido dismutasa y el inhibidor tisular de metaloproteinasas-1, promoviendo en consecuencia una regulación a la baja de MMP-13 en tejido sinovial (81). Por lo tanto, quercetina reduce la degeneración del tejido

articular en la OA al bloquear el estrés oxidante e inhibir la degradación de los componentes de la MEC del cartílago.

Existen diferentes propiedades potenciales de apigenina en OA. Crasci *et al.* informaron que apigenina puede ser un neutralizador de RL y un potente inhibidor de productos finales de glicación avanzada. También demostraron que la apigenina restaura la producción de glicosaminoglicanos (GAG) cuando se tratan condrocitos articulares humanos previamente estimulados con IL-1 β (82).

8.4 Efecto de compuestos bioactivos de la miel en la condroprotección

La actividad biológica de baicalina ha sido consistente en diferentes estudios, lo que demuestra que este flavonoide protege a los condrocitos de la apoptosis y la degradación de la MEC (43, 83, 84). En este sentido, Chen *et al.* identificaron a baicalina como un potencial candidato para el tratamiento de la OA, ya que previno la destrucción del cartílago y el alivio de la sinovitis en un modelo *in vivo* de OA (83). Además, baicalina es capaz de suprimir la expresión de genes relacionados con la apoptosis inducida por H₂O₂ (85, 86), y favorece la expresión de COL2A1, ACAN y SOX9 en condrocitos estimulados con H₂O₂ (86).

Huang y colaboradores reportaron recientemente que baicalina reduce los niveles de IL-1 β y suprime la expresión de colágena I, atenuando la degeneración del cartílago y promoviendo la proliferación de condrocitos articulares de conejo. De igual forma, se favoreció la restauración de MEC a través de la secreción de COL2A1 y ACAN por una regulación positiva del gen SOX9 (87).

Es bien sabido que el mantenimiento de la autofagia es esencial para preservar la integridad del cartílago. En este sentido, un nuevo estudio documentó que baicalina ejerce un papel anti apoptótico a través de la regulación positiva de Bcl-2 y la activación de la autofagia vía miR-766-3p/AIFM1 (factor inductor de apoptosis asociado a mitocondria 1), culminando en una mayor síntesis de componentes de la MEC en condrocitos humanos osteoartríticos (84). Del mismo modo, Ansari *et al.* descubrieron que buteína puede activar la autofagia en condrocitos humanos estimulados con IL-1 β al inhibir la señalización de mTOR (88).

Teniendo en cuenta los diversos beneficios para la salud y el bienestar general que se han asociado con la miel y sus componentes, el uso emergente de estos productos como una estrategia complementaria para regular mecanismos moleculares subyacentes a la homeostasis articular está dando lugar a futuras investigaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos para la reparación del cartílago.

9. Miel en ingeniería de tejidos para la reparación del cartílago

La capacidad del cartílago para la auto-regeneración es baja, incluso cuando se usan andamios celulares ampliamente utilizados en ingeniería de tejidos. Sin embargo, muchas estrategias prometedoras aún intentan promover la reparación y regeneración del cartílago articular. En este sentido, estudios recientes se han centrado en el desarrollo de andamios basados en biomateriales-miel, como los hidrogeles para acelerar la reparación del cartílago. Esto debido a las propiedades antibacterianas intrínsecas de la miel y su viscosidad que mejoran las características mecánicas de

los hidrogeles (89, 90, 91). La inclusión de miel Manuka en hidrogeles ha promovido la condrogénesis de células madre mesenquimales humanas *in vitro* mediante el aumento de la expresión de COL2A1, así como la síntesis de GAG y proteoglicanos, sin mostrar efectos citotóxicos (92, 93). Hasta la fecha, los estudios *in vivo* de la actividad de los hidrogeles que contienen miel han mostrado resultados significativos en la inhibición de infecciones (93), lo que representa una herramienta prometedora para la regeneración del cartílago.

10. Bioseguridad de la miel para aplicaciones clínicas

El creciente interés por la miel para uso médico está dando lugar a una estricta regulación de su calidad y seguridad. La miel puede contener compuestos tóxicos que incluyen pesticidas, metales pesados y antibióticos debido a la contaminación ambiental en las zonas de recolección de miel (94, 95, 96, 97, 98).

La contaminación bacteriana es otro factor relevante que se debe tener en cuenta para asegurar que la miel sea apta para fines terapéuticos (55, 99). Diversos estudios han reportado la presencia de diferentes géneros bacterianos y levaduras en miel incluyendo *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Saccharomyces*, entre otros. Asimismo, esporas bacterianas, particularmente de *Bacillus* y *Clostridium* han sido regularmente encontradas en miel no irradiada representando un riesgo sanitario cuando se implementa este producto como terapia adyuvante (100, 101, 102).

En este contexto, el uso de miel de grado médico garantiza su seguridad para la aplicación clínica (103, 104). Se ha demostrado que las actividades biológicas de la

miel como propiedades antimicrobianas, cicatrizantes, antioxidantes y antiinflamatorias aún están presentes después de la esterilización con radiación gamma y las condiciones de almacenamiento se prolongan (100, 105, 106, 107).

Aunque la miel Manuka de grado médico está siendo investigada ampliamente como una nueva estrategia terapéutica no farmacológica en diferentes partes del mundo, están surgiendo otros tipos de miel con una actividad biológica similar o superior. En los primeros informes, la miel de abejas sin aguijón, incluidas *Melipona spp.*, *Trigona spp.*, *Tetragonisca spp.* y *Scaptotrigona spp.*, han mostrado propiedades terapéuticas para tratar la inflamación (108, 109), cicatrización de heridas (41) y estrés oxidante (109). Además, la alta biodisponibilidad de compuestos como apigenina, crisina y quercetina, ha sido reportada previamente en miel de abejas sin aguijón (110).

Por lo tanto, miel de abeja sin aguijón posee un potencial biológico para aplicaciones en la medicina moderna y en patologías relacionadas con una alteración de la homeostasis articular.

III. Justificación

La OA ocupa el cuarto lugar en mujeres y octavo en hombres en edad reproductiva como enfermedad debilitante y discapacitante, lo que impacta económicamente al sector salud. Más aún, considerando la transición epidemiológica de envejecimiento en nuestro país y que hoy en día los principales problemas de salud a los que se enfrenta la población geriátrica son las patologías relacionadas con discapacidad, las prioridades de acción social y del sistema de salud es impulsar el desarrollo de alternativas terapéuticas de bajo costo, que no repercutan en la estabilidad financiera y calidad de vida de los pacientes con OA (10, 111).

Actualmente, la administración intraarticular de ácido hialurónico representa el tratamiento estándar en OA como agente viscoelástico, ya que su potencial de lubricación permite disminuir la fricción y deterioro del cartílago. Sin embargo, el ácido hialurónico es un principio activo de alto costo que no revierte el daño (112, 113).

En este sentido, la miel de abeja es un gran candidato para ser estudiado en la terapia de viscosuplementación dado que por sus características fisicoquímicas posee además de las propiedades lubricantes, propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, senolíticas y condroprotectoras promovidas por diversas moléculas bioactivas. Estas podrían en general regular la homeostasis articular y reparar el daño del cartílago articular.

En este trabajo buscamos generar una miel de grado médico que sea inocua para la infiltración de la articulación de rodilla. La relevancia de este estudio es el desarrollo de un viscoelástico a partir de una sustancia natural y económica, que podría tener un

impacto positivo en la salud de la población mexicana que sufre de OA contribuyendo al desarrollo de políticas de salud pública.

En un futuro cercano, el uso de la miel de grado médico como una herramienta terapéutica adyuvante no farmacológica podría aportar con la reducción de las limitaciones físicas, discapacidad, estrés mental y carga socioeconómica que comúnmente se observan en las personas con OA.

IV. Hipótesis

La miel de grado médico representa un viscoelástico seguro y con propiedades antioxidantes que permite su uso en la viscosuplementación articular.

V. Objetivo General

Evaluar la inocuidad y propiedades antioxidantes de la miel de grado médico para su uso como viscoelástico en articulación de rodilla.

VI. Objetivos Particulares

1. Estandarizar un método para la generación de miel de grado médico.
2. Evaluar la capacidad antioxidante de la miel de grado médico.
3. Evaluar el efecto biológico de la miel de grado médico en esferoides de condrocitos humanos.
4. Evaluar el efecto de la viscosuplementación de miel de grado médico en articulación de rodilla de rata Wistar.

VII. Materiales y Métodos

Obtención y purificación de miel

La miel fue recolectada en un apiario localizado en Yucatán en el mes de junio durante los años 2019-2021. Dicho apiario posee colmenas de abeja *Melipona beecheii*, las cuales se caracterizan por no poseer aguijón. Para la colecta de la miel se utilizaron contenedores estériles de 500 mL y jeringas estériles desechables de 10 mL. Una vez que el contenedor alcanzó su volumen final, se procedió a cerrarlo completamente y cubrirlo con envoltura plástica adherente para ser transportado a la Ciudad de México. Posteriormente, la miel fue alícuotada en tubos de centrifuga estériles de 50 mL en un gabinete de bioseguridad nivel AII (1300 Series A2, ThermoScientific). Todas las alícuotas fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso. Antes de cada determinación analítica, las alícuotas se mantenían a temperatura ambiente (26 ± 2 °C).

Generación de miel de grado médico

Para la obtención de miel de grado médico, se colocaron 45 mL en contenedores cónicos de polipropileno transparente que permitió realizar la irradiación de manera uniforme en las instalaciones de la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Fuente de irradiación

La irradiación se llevó a cabo a temperatura ambiente en presencia de aire empleando una fuente de ^{60}Co (Gammabeam 651 PT, MDS Nordion, Kanata, ON, Canada) a una

tasa de dosis promedio de 9.68 kGy h⁻¹. Las muestras se tomaron de la cámara a diferentes intervalos de tiempo predeterminados para lograr dosis absorbidas entre 5 y 20 kGy. Las condiciones de temperatura se mantuvieron controladas en cada una de las muestras.

Almacenamiento de miel irradiada

Todas las alícuotas irradiadas fueron almacenadas a temperatura ambiente (26 ± 2 °C), protegidas tanto de la luz como de la humedad hasta su empleo para posteriores análisis.

Análisis microbiológico

Se demostró la inocuidad de la miel mediante estudios microbiológicos realizados en el Servicio de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII. Para ello, se determinó la carga total de microorganismos aerobios por el método en placa y sistema BACTEC. De igual forma, se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer con y sin choque de calor a 80 °C. Los resultados se contrastaron con los valores obtenidos en muestras de miel sin irradiar.

Análisis multi-residual de plaguicidas

El análisis de plaguicidas presentes en la miel se realizó mediante cromatografía de gases y líquidos acoplado a espectrometría de masas/masas para elucidar el perfil y concentración de compuestos orgánicos existentes en la muestra. Para efecto de esta determinación, se solicitó al Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes del SENASICA el servicio de detección y cuantificación de plaguicidas,

el cual forma parte del programa de monitoreo de residuos tóxicos y contaminantes para certificar la inocuidad de la miel de abeja.

Los analitos determinados en la miel fueron: Azinphos methyl, Benalaxyl, Carbaryl, Carbofuran, Fenpropathrin, Fenthion, Hexythiazox, Indoxacarb, Nitenpyram, Profenofos, Pyriproxyfen, Tebuconazole, Thiodicarb, BHC alpha , Boscalid, Bromopropylate, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos methyl, Cyflutrin , Cyhalothrin-Lambda, Diethofencarb, Endosulfan sulfate, Esfenvalerate, Ethion, Fenitrothion, Fenvalerate, Heptachlor epoxide (Isomer B), Metalaxyl, Mevinfos, Parathion, Parathion methyl, Permethrin cis, Permethrin trans, Phorate, Propiconazole I, Propiconazole II, Pyridaben, Vinclozoline.

Evaluación de capacidad antioxidante

Para la determinación de capacidad antioxidante se realizaron 4 métodos relacionados con la cuantificación de compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antioxidante total y ensayo de DPPH.

Preparación de la muestra

Se pesó 1g de las muestras de miel irradiada a diferentes dosis de ^{60}Co en vaso de precipitado de 50 mL. Posteriormente, fueron diluidas con 7 mL de agua milliQ aplicando agitación durante 5 minutos para favorecer la homogenización de la muestra. La solución fue almacenada en tubos de centrifuga de 15 mL cubiertos con papel aluminio a 4 °C.

Contenido total de compuestos fenólicos

El contenido total de fenoles se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. Se tomó un volumen de 60 μL de la solución de miel diluida y se mezcló con 300 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 N (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, se agregaron 240 μL de carbonato de sodio (75 g/L) (Sigma-Aldrich, USA) y se agitaron en un vortex nuevamente. Después de 2 h de incubación en oscuridad, la absorbancia fue determinada a 760 nm en un lector de placas multimodal Synergy HTX (BioTek, USA). Se preparó una curva estándar de ácido gálico comprendiendo las concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de miel (mg EAG / 100 g miel).

Contenido total de flavonoides

El contenido total de flavonoides fue determinado mediante el método colorimétrico con cloruro de aluminio usando el kit Flavonoids Colorimetric Assay (MBS2556557, MyBioSource). Se tomaron 270 μL de la muestra y se añadieron 15 μL de Nitrato de sodio (reactivo 2) seguido de vortex e incubación por 5 minutos. Se procedió agregando 15 μL de cloruro de aluminio (reactivo 3) con aplicación de vortex e incubación por 5 min. Finalmente, se colocaron 200 μL de hidróxido de sodio (reactivo 4) y se procedió a incubar la reacción por 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 415 nm y 510 nm para quercetina y rutina, respectivamente en un lector de placas multimodal Synergy HTX (BioTek, USA). La curva estándar de quercetina y rutina fueron realizadas incluyendo dosis de 0, 10, 20,

40, 60, 80, 100, 120 y 150 µg/mL. Los resultados se presentaron como mg de equivalentes de quercetina (mg EQ) o rutina (mg ER) por cada 100 g de miel.

Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total (CAT) de la miel se determinó con el kit Antioxidant Assay (MAK334, Sigma-Aldrich, USA). En una placa de 96 pozos, se colocaron 20 µL de la muestra y se agregó 100 µL de la mezcla de reacción previamente preparada en fresco bajo la siguiente relación: 100 µL del reactivo A + 8 µL del reactivo B. Se procedió a mezclar mediante movimientos oscilatorios e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. La lectura de absorbancia se determinó a 570 nm en un lector de placas multimodal Synergy HTX (BioTek, USA). Se realizó una curva estándar de trolox comprendiendo las dosis de 0, 100, 200, 300, 600, 800 y 1000 µM. Los resultados de la CAT fueron expresados como equivalentes de trolox (µM) / g de miel.

Ensayo de radical DPPH

El DPPH fue disuelto en metanol a una concentración final de 0.02 mg/mL. Una alícuota de 25 µL de muestra fue mezclada con 225 µL de la solución de DPPH en un tubo de 500 µL. Se procedió aplicando vortex seguido de una incubación en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue registrada a 517 nm en un lector multimodal Synergy HTX (BioTek, USA).

La actividad de eliminación de radical de DPPH fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de eliminación DPPH (\%)} = [1 - ((A1 - A2) / A3)] \times 100$$

En donde A1 consiste en la absorbancia de la muestra

A2 consiste en la absorbancia de la muestra de miel (25 μ L) + metanol (225 μ L)

A3 consiste en la absorbancia de metanol (25 μ L) + DPPH (225 μ L)

Finalmente, la capacidad antioxidante en términos de equivalentes de ácido ascórbico (AEAC, por sus siglas en inglés ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) fue determinado y expresado como mg de equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 g de miel (mg EAA / 100 g miel) usando una curva estándar de ácido ascórbico con un rango de dosis de 5 a 40 μ g/mL.

Potencial biológico de miel de grado médico en un modelo 3D de condrocitos humanos

Muestras de cartílago articular humano

Este estudio fue realizado siguiendo la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (39/20 SP-1). Todos los participantes fueron debidamente informados sobre el objetivo del estudio y firmaron el formulario de consentimiento informado.

Médicos especialistas del Servicio de Reconstrucción Articular Cadera y Rodilla y del Servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopia obtuvieron biopsias de cartílago hialino del área de no carga de las rodillas (escotadura) de pacientes que se sometieron a artroscopia de rodilla o artroplastia total de rodilla. Para todos los casos, la biopsia se recolectó mediante raspado utilizando una cucharilla de 10 mm y posteriormente extraer el tejido con una pinza de cuerpos.

Las muestras fueron colocadas en MDEM/F12 suplementado con antibiótico al 10 % y transportadas al laboratorio en un lapso no mayor de 2 horas. Cada muestra se separó en dos secciones, de las cuales una se utilizó para inclusión en parafina y la otra para el aislamiento de condrocitos.

Evaluación de los componentes de la MEC en muestras de cartílago articular

Las muestras de cartílago se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 μ m, los cuales se desparafinaron con xilol seguido de un proceso de hidratación con alcohol etílico. Las muestras se incubaron con anticuerpo primario para SOX-9 (1:100, abcam 76997), agrecano (1:100, Novus bio BC-3), colágena-2 (1:100, Thermo MA5-12789) o colágena-1 (1:100, CellSignaling 66948) seguido de una incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (1:200, CellSignaling 4408S) o anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 647 (1:200, CellSignaling 4410S), según correspondiera. La tinción nuclear se realizó con medio de montaje Antifade Vectashield con DAPI (Vector Laboratories H-1200). Finalmente, las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia (EVOS FL Auto, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Aislamiento y cultivo primario de condrocitos humanos

Inmediatamente después del proceso de recolección, las muestras de cartílago se cortaron en trozos pequeños aproximadamente de 1 mm y los condrocitos se aislaron por digestión con colagenasa tipo II (2 mg/ml) en medio DMEM/F12 (Gibco, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) durante 6 h en una incubadora a 37 °C con

agitación constante (Enviro-Genie, Scientific Industries Inc., Bohemia, Nueva York, EE. UU.). Las células aisladas se cultivaron a una densidad de 10,000 células/cm² en medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y antibiótico al 1 % (Penicilina / Estreptomicina) (Gibco, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se realizó un cultivo en monocapa a 37 °C con 5 % de O₂ (hipoxia) y 5 % de CO₂ en humedad de saturación o a 37 °C con 21 % de O₂ (normoxia) y 5 % de CO₂ en humedad de saturación hasta llegar a confluencia del 85-90 %. Los condrocitos en el pase 2 (P2) se usaron para generar los esferoides.

Desdiferenciación de condrocitos humanos en cultivo en monocapa

El porcentaje de células con morfología similar a la de los condrocitos se analizó considerando la forma y diámetro. Asimismo, se tomaron imágenes de células cultivadas en hipoxia y normoxia utilizando un microscopio invertido (EVOS FL Auto, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se contaron un total de 100 células en tres eventos independientes.

Fabricación de moldes de agarosa

Agarosa ultrapura se disolvió en agua inyectable (4 % p/v), se calentó y se vertió en el fondo de una placa de 12 pozos para imprimir un molde personalizado de polidimetilsiloxano (PDMS) (Research Micro Stamps, Clemson, SC, EE. UU.) que contenía estructuras de tipo columnas circulares. Se generaron moldes con poros de 250 µm de diámetro y 250 µm de profundidad. Una vez que la agarosa polimerizó a temperatura ambiente, la estampa se separó del molde de PDMS con ayuda de pinzas

de disección sin dientes. Posteriormente, cada pozo se hidrató con PBS suplementado con antibiótico-antimicótico al 2 %. Finalmente, la placa se colocó bajo radiación UV durante 60 min y luego se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Generación de esferoides condrales

Los esferoides se formaron sembrando 6×10^5 condrocitos en las estampas de agarosa en presencia de medio condrogénico que consistía en DMEM/F12 suplementado con SFB al 5 %, ácido ascórbico-2-fosfato 200 μM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 50 μL Insulina-Transferrina-Selenio 100 \times (Gibco, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), dexametasona 100 μM , TGF- β 10 ng mL^{-1} (PeproTech, Cranbury, NJ, EE. UU.) y 100 unidades mL^{-1} de penicilina y 100 unidades mL^{-1} de estreptomicina (Gibco, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Los esferoides se colocaron en una incubadora humidificada en condiciones de cultivo hipóxicas o normóxicas durante 14 días. El medio de cultivo se cambió cada 48 h. El número de células por esferoide se estimó basándose en el número de micropocillos y el número de células sembradas.

Ensayo de viabilidad celular

Los esferoides en las estampas de agarosa se lavaron suavemente con PBS y se incubaron con calceína-AM (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y yoduro de propidio (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Después de 30 min de incubación, se evaluó la viabilidad utilizando un microscopio de fluorescencia invertido y el software

de imagen Pearl Scope 64 (EVOS FL Auto, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) para cuantificar la señal de fluorescencia. Se obtuvo la media de la señal de fluorescencia para calceína y yoduro de propidio.

Evaluación morfométrica

La morfología de los esferoides derivados de condrocitos humanos se analizó utilizando el software de imagen Pearl Scope 64 (EVOS FL Auto, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El diámetro, el área (A) y el perímetro (p) se midieron durante los 14 días de cultivo en hipoxia y normoxia. La circularidad se calculó mediante la fórmula $f_{\text{circularidad}} = (4\pi A)/p^2$.

Tinción de glucosaminoglicanos

Los esferoides se recolectaron y se fijaron con formaldehído al 4 %. La tinción de GAGs se realizó utilizando azul alciano en ácido acético al 3 % (pH 2,5) durante 40 minutos. La cuantificación de la tinción se realizó utilizando el software ImageJ. Se usó el umbral de color para seleccionar y medir las áreas teñidas de azul correspondiente al colorante azul alciano. El porcentaje de tinción con azul alciano se calculó dividiendo el área teñida de azul por el área total del esferoide.

Análisis de expresión génica

Se utilizó qRT-PCR para cuantificar la expresión de genes relacionados con la condrogénesis. Los condrocitos y esferoides se disolvieron en 0.6 ml de buffer de lisis

(Pure Link RNA, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y el RNA total se aisló de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se retro-transcribió un total de 500 ng de RNA total en una reacción de volumen final de 20 µL utilizando el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los productos de cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La qPCR se realizó utilizando 10 µL de RT2 SYBR Green FAST Mastermix (Qiagen, Alemania) en un volumen final de 20 µL bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 s, con una T_m y tiempos variables para el paso de alineación y elongación (Tabla 1). La amplificación de qPCR se realizó con el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemania). La expresión fue normalizada con el gen RPL27.

Tabla 1. Oligos usados para el análisis de expresión génica por qRT-PCR.

Gen	Oligo Qiagen o secuencia diseñada	Condición de qRT-PCR
<i>SOX9</i>	PPH02125A	60 °C–60 s
<i>ACAN</i>	PPH06097E	60 °C–60 s
<i>COMP</i>	PPH07086B	60 °C–60 s
<i>SNAI1</i>	PPH02459B	60 °C–60 s
<i>LOXL2</i>	PPH10275A	60 °C–60 s
<i>RPL27</i>	PPH00443B	60 °C–60 s
<i>COL1A1</i>	PPH01299F	60 °C–60 s
<i>COL2A1</i>	Forward ATGAGGGCGCGGTAGAGA Reverse CCCTGACACCGAAGGACAG	62 °C–47 s
<i>COL10A1</i>	Forward CCCAGCACGCAGAATCCAT Reverse CCTGTGGGCATTTGGTATCG	58 °C–60 s

Esferoides tratados con miel de grado médico

Los esferoides embebidos en las estampas de agarosa se lavaron gentilmente con PBS y se incubaron con diversas dosis (0.5, 1, 3 y 5 % v/v) de miel de grado médico en medio DMEM/F12 suplementado con SFB al 10 %. Se incubaron durante 24 h y se procedió a realizar el ensayo de viabilidad con calceína-AM y yoduro de propidio ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para el análisis de los resultados se obtuvo la media de la señal de fluorescencia para calceína y yoduro de propidio con ayuda del software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

Determinación de la inocuidad de la miel de grado médico en rodilla de rata

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (39/20 SP-2). Se utilizaron ratas Wistar, machos, con un peso promedio de 370 g, provenientes del Bioterio de la FES Cuautitlán UNAM. Se obtuvieron un total de 24 especímenes que fueron aleatoriamente divididos en 2 grupos; miel de grado médico y solución salina. Todos los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz/oscuridad (12 horas c/u), cambios de cama cada 24 horas y se les suministró dieta estándar comercial en forma de *pellets* extrusado (LabDiet 5010) y agua con acceso *ad libitum*.

Un día previo a la administración del tratamiento vía intraarticular, se realizó tricotomía de patas posteriores para un mayor acceso durante la viscosuplementación y visualización en los estudios ecográficos.

Tratamiento experimental

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y se procedió a realizar antisepsia con yodopovidona. Posteriormente, se inoculó en la rodilla derecha miel de grado médico o solución salina a un volumen total de 30 μ L. Se aplicó 1 dosis semanal, logrando un total de 3 infiltraciones.

Ultrasonografía articular de rodilla

Para el análisis de alteraciones estructurales del cartílago hialino, se obtuvieron ecografías basales de cada articulación y por semana de tratamiento. Mediante sujeción y manejo, las ratas fueron colocadas en posición decúbito para mayor acceso a la articulación de rodilla en posición flexionada y en reposo. Se aplicó gel de ultrasonido estéril sobre el área de la articulación y se colocó el transductor paralelo al fémur. Asimismo, se dio seguimiento de la inflamación en la cavidad articular mediante señal Doppler. El examen fue realizado por dos reumatólogos con alta experiencia en ecografía musculoesquelética utilizando el equipo Sonosite MicroMaxx equipado con transductor lineal de palo de hockey de 6-13 MHz.

Preparación del tejido articular

En el día 21 posterior al inicio del tratamiento se procedió con el sacrificio de las ratas. Se obtuvieron ambas articulaciones mediante un corte a 1 cm proximal de la superficie articular para fémur y a 1 cm hacia distal de la superficie articular para tibia. A

continuación, se retiró la mayor cantidad de piel y músculo de las muestras de rodilla y se fijaron en formalina amortiguada al 10%.

Un total de 5 ratas por grupo fueron usadas para registro fotográfico del daño en la superficie del cartílago hialino. Se procedió a lavar las articulaciones con PBS 1x, seguido de una exposición de los cóndilos femorales para realizar el estudio macroscópico del cartílago.

Para estudios histológicos, en el resto de las articulaciones de rodilla (n=7) se realizó la descalcificación con una solución acuosa de ácido nítrico al 18% y ácido acético al 10%. Después de un lavado con agua jabonosa por 8 horas a temperatura ambiente, los especímenes se embebieron en parafina Paraplast.

Histología de la articulación de rodilla

Mediante tinción histológica se determinó la presencia de daño en la articulación. Brevemente, se realizaron cortes sagitales con un grosor de 5 μm , los cuales fueron desparafinados e hidratados gradualmente. Finalmente, se procedió con la tinción de hematoxilina / eosina y azul alciano para evidenciar posibles alteraciones en el tejido articular.

Biodisponibilidad de moléculas bioactivas derivadas de la miel y hepatotoxicidad

Se recolectaron muestras sanguíneas en tubos Vacutainer rojo mediante punción cardiaca durante el proceso de sacrificio. Para la obtención del suero, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, el suero fue alicuotado en tubos estériles de 0.6 mL y almacenado a -80 °C hasta su uso.

Análisis de fenoles totales en suero

Las muestras de suero fueron descongeladas en frío y se realizó una dilución 1:10 con PBS 1x estéril. A continuación, se procedió con la metodología previamente descrita para el contenido total de compuestos fenólicos del apartado generación de miel de grado médico.

Histología de tejido hepático

Durante el sacrificio, muestras de tejido hepático fueron recolectadas y lavadas con PBS 1x. Las muestras de hígado se conservaron en formalina amortiguada al 10 % durante 24 h. A continuación, el tejido se deshidrató con una serie de alcohol etílico a concentraciones crecientes del 70 % al 100 % y finalmente con xilol. Se procedió a embeber la muestra en parafina Paraplast y posteriormente, se obtuvieron cortes de 5 μm para el análisis histológico. Los cortes fueron desparafinados e hidratados gradualmente para realizar la tinción de hematoxilina / eosina siguiendo los protocolos estándares para histología.

Análisis estadístico

La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Ante una distribución normal, los datos se presentaron como medias con desviación estándar (SD) para propiedades antioxidantes de la miel y como medias con intervalo de confianza del 95 % (IC) para estudios en esferoides provenientes de condrocitos osteoartríticos humanos. Cuando se obtuvo una distribución no normal, se usó la mediana y rango intercuartílico (RIC) como medida de tendencia central y dispersión, respectivamente.

Para el análisis de las propiedades antioxidantes, se determinó si existe una diferencia entre la miel tratada a diversas dosis de radiación gamma mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Tukey para comparar múltiples grupos.

Para el diámetro del esferoide y la tinción con azul Alciano de esferoides hipóxicos, se realizó ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Tukey para comparar múltiples grupos.

Para el análisis del porcentaje de células con morfología de condrocitos en normoxia e hipoxia a lo largo del tiempo de cultivo, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías. Se realizó la prueba *t* de *student* para analizar la diferencia entre la expresión génica, la tinción con GAGs y el ensayo de viabilidad relacionados con la normoxia y la hipoxia en esferoides. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para valores que no se distribuyeron normalmente.

Para la expresión génica en el cultivo primario y viabilidad de esferoides tratados con

miel de grado médico, se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la comparación por pares de Dunn como una prueba *post hoc* para determinar una diferencia entre múltiples grupos.

Para las determinaciones de fenoles en suero de ratas y análisis de peso, se realizó la prueba *t* de *student* para determinar si existe una diferencia entre los dos grupos experimentales; ratas con miel de grado médico y ratas con solución salina.

Para todos los casos, se consideró un valor de $P < 0.05$ como significativo. Los resultados obtenidos de cada uno de los objetivos planteados fueron analizados con el programa STATA versión 16 (StataCorp, College Station TX, USA) y graficados en el programa GraphPad Prism 9.0.1 (GraphPad Software, San Diego CA, USA).

VIII. Resultados

Obtención de miel de grado médico

Lotes de 500 ml de miel de abeja *Melipona beecheii* fueron recolectados por apicultores en la Península de Yucatán, México. En la figura 3a se puede observar una colmena típica de abeja sin aguijón, de la cual fue necesario emplear jeringas estériles desechables para recuperar la miel y disminuir su manipulación.

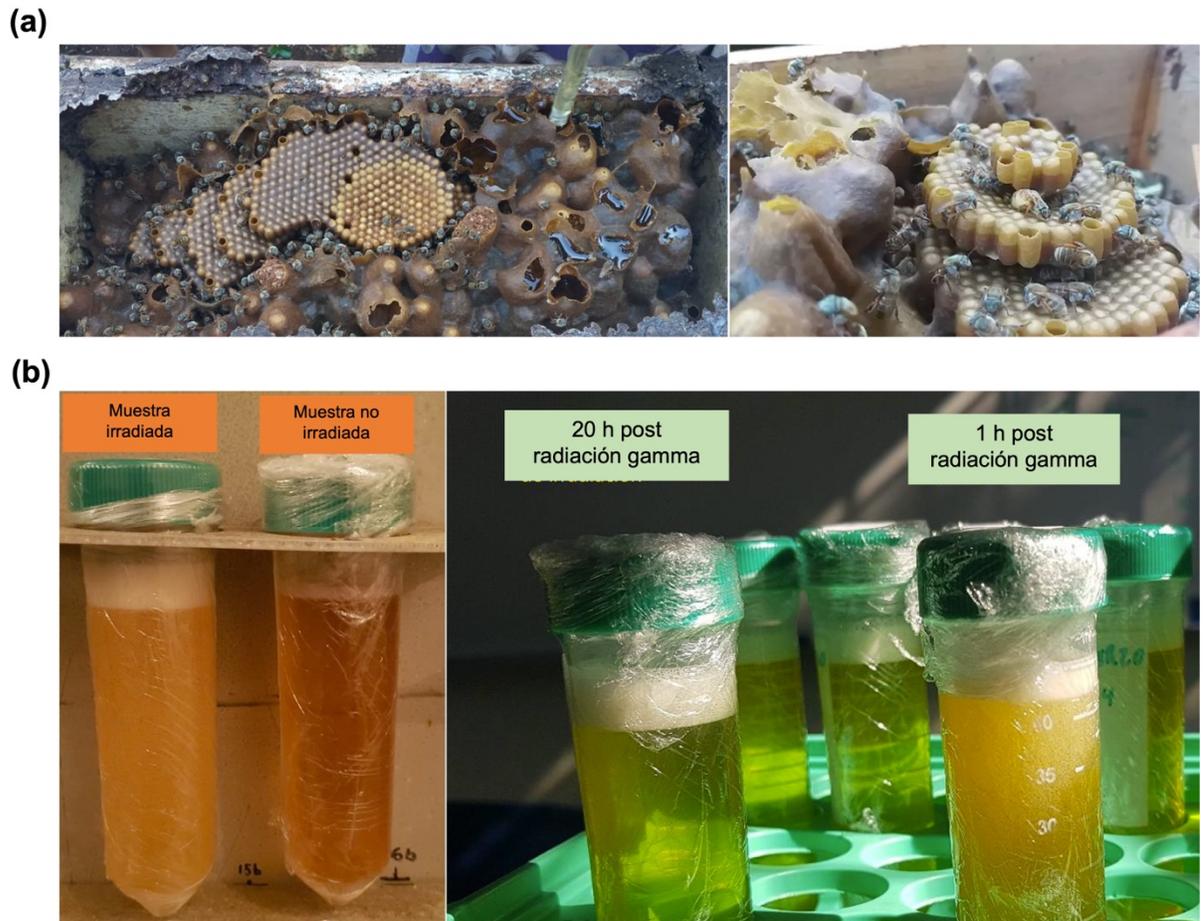


Figura 3. Recolección de miel de abeja *Melipona beecheii* y obtención de miel de grado médico.

(a) Apicultores recolectando miel con ayuda de jeringas desechables. (b) Alteración de la apariencia de la miel por efecto de la radiación gamma al tiempo 1 minuto, 1 h y 20 h post proceso.

Cambios en la apariencia de la miel, principalmente turbidez y coloración fueron observados al salir del proceso de radiación. Sin embargo, después de 20 h se observó que la miel volvió a tener una apariencia translúcida (Figura 3b). Respecto a los parámetros de temperatura, esta se mantuvo controlada a 24 °C con una variación de hasta 3 °C durante el proceso de radiación. Los tiempos de irradiación para cada dosis se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros para la radiación de miel con ⁶⁰Co.

Dosis (kGy)	Tiempo de irradiación (minutos)	Volumen (mL)
5	31	45
10	62	45
15	93	45
20	124	45

Descontaminación microbiológica mediante radiación gamma

El perfil microbiológico de la muestra de miel no irradiada mostró contaminación con bacterias *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* y *Sphingomonas spp* en el estudio de carga total de microorganismos aerobios (CTMA) en agar sangre de ternero al 5 %. De igual forma se demostró la presencia de bacterias y/o levaduras mediante el sistema BACTEC en un medio de cultivo para microorganismos aeróbicos. Finalmente, el conteo de esporas sin choque térmico fue de 110 ± 17.3 por mL y con choque térmico a 80 °C fue de 286 ± 5.7 por mL.

Por otra parte, la radiación gamma con ^{60}Co mostró ser suficientemente efectiva para el control microbiológico de las muestras de miel. La actividad de las diversas dosis de ^{60}Co en el perfil microbiológico se describe en la tabla 3. Una completa descontaminación microbiológica incluyendo erradicación de esporas fue alcanzada a la dosis de 15 kGy.

Tabla 3. Efecto de radiación gamma en la contaminación microbiológica de la miel.

Dosis (kGy)	CTMA	Sistema BACTEC medio aeróbico	Conteo de esporas (por ml) media \pm SD	
			Previo al choque de calor	Choque de calor a 80 °C
0	+	+	110 \pm 17.3	286 \pm 5.7
5	-	+	ND	ND
10	-	+	ND	ND
15	-	-	ND	ND
20	-	-	ND	ND

CTMA: carga total de microorganismos aeróbicos, ND: No detectado

Ausencia de plaguicidas en muestras de miel

No se detectó la presencia de pesticidas entre un total de 39 analitos. En la figura 4 se observa el resultado negativo en la determinación multiresidual de plaguicidas emitido por Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes del SENASICA entre los cuales se encuentran nitrofuranos, organofosforados y organoclorados, formamidas y piretroides.

 SADER SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL	INFORME DE RESULTADOS	 SENASICA
	CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE PLAGUICIDAS Y CONTAMINANTES	
SMEC-PR-IR-01 2018.12 Ver.02		
Número de Informe: -----	Fecha de emisión: Febrero 13, 2020	Página 1 de 1
1. DATOS DEL CLIENTE		
Nombre: Instituto Nacional de Rehabilitación Domicilio: Calz México-Xochimilco 289, Coapa, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14389 Ciudad de México, CDMX Contacto: Dr. Alberto López Reyes		
2. DATOS DE LA MUESTRA		
Clave interna: INR20 Producto: Miel Variedad: S/E Programa: CLIENTE EXTERNO		
Condiciones de Recepción: Cantidad: --- Fecha: Febrero 10, 2020		
Datos de Origen: Clave: --- Resp. Muestreo: Dr. Alberto López Reyes Empresa: Instituto Nacional de Rehabilitación Rep. Legal: --- Domicilio: Calz México-Xochimilco 289, Coapa, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14389 Ciudad de México, CDMX Municipio: Tlalpan Estado: CIUDAD DE MÉXICO Origen: --- Exportador: --- OISA: --- Certificado Fitosanitario: --- Observaciones: ---		
3. ANÁLISIS DE LA MUESTRA		
Descripción: Plaguicidas Multiresidual. Fecha de inicio: Febrero 11, 2020 Fecha de término: Febrero 12, 2020 Área de análisis: Análisis y Control de Residuos		
4. RESULTADOS		
Determinación	Concentración mg/Kg (ppm)	
PLAGUICIDAS	NO DETECTADO	
5. OBSERVACIONES		
La muestra se recibe en 3 tubos falcon envueltos con papel aluminio dentro de una bolsa tipo ziploc.		

CNRDOGM No. SA-0338-005/11; vigente a partir de: 2011/12/12, CNRPyC No. SA-9410-009/12; vigente a partir de: 2012/11/16, LDDOP No. SA-0573-014/14; vigente a partir de: 2014/06/26, MÓVIL 2 No. SA-0737-027/16, MÓVIL 3 No. SA-0738-028/16 y MÓVIL 4 No. SA-8739-029/16; vigentes a partir del 2016/06/16.


 IBQ Sergio Iván Hernández Hernández
 Jefe de Departamento de Instrumentación Analítica

*La información presentada en este documento tiene el carácter de reservada y confidencial en términos de los artículos 14 fracción II, IV y VI, 18 fracción I y II, y 19 de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental. Los resultados mostrados únicamente están relacionados con las muestras recibidas y analizadas por el laboratorio. Este documento no es válido si presenta tachaduras o enmendaduras.

Km. 37.5, Carretera Federal México – Pachuca, Tecámac, Edo. de México, C.P. 55740,
 Tel. +52 (55) 5905 1000 Ext. 53036 y 54351, daniel.gonzalez@senasica.gob.mx, sofia.heredia@senasica.gob.mx

Figura 4. Informe de plaguicidas multiresidual en miel emitido por Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes del SENASICA. Determinación de 39 analitos realizada mediante cromatografía de líquidos y gases acoplada a detector de masas incluyendo nitrofuranos, organofosforados y organoclorados, formamidas y piretroides.

Efecto de la radiación en las propiedades antioxidantes

Se analizó la capacidad antioxidante de la miel irradiada con ^{60}Co usando como indicadores el contenido total de fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante total (CAT) y ensayo de DPPH. De forma general, se observó un incremento en las propiedades antioxidantes dependiente de la dosis de radiación gamma con ^{60}Co .

Contenido total de fenoles

Los valores del contenido total de fenoles variaron de 60.86 ± 7.37 mg EAG / 100 g de muestra en miel no irradiada hasta 83.22 mg EAG / 100 g de muestra en miel tratada a 20 kGy con ^{60}Co . En general, la miel expuesta a radiación gamma mostró un incremento significativo ($p < 0.002$) en la concentración de fenoles totales en cada una de la dosis en comparación con miel no irradiada (Figura 5a).

Contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides expresado en mg EQ / 100 g de muestra fue de 21.4 ± 2.34 , 22.96 ± 2.36 , 25.32 ± 2.54 , 28.08 ± 3.51 y 30.88 ± 2.86 para las dosis de 0, 5, 10, 15 y 20 kGy, respectivamente. Obteniendo una diferencia significativa a partir de la miel tratada a 10 kGy en comparación con la muestra no irradiada ($p < 0.001$). De forma similar, cuando se analizaron los resultados en mg ER / 100 g de muestra, los valores tendieron a incrementar con el aumento de la dosis de ^{60}Co observándose una diferencia significativa a partir de la dosis de 10 kGy (Figura 5b y c).

Actividad antioxidante

Dado que sólo las muestras de 15 y 20 kGy mostraron un adecuado control microbiológico, para los estudios posteriores se consideraron estas dos muestras comparando sus efectos con miel no irradiada.

Mediante el ensayo de CAT se observó que la radiación gama incrementa las propiedades antioxidantes de la miel. Cambios significativos expresados en equivalentes de Trolox (μM) / g de muestra fueron observados en la CAT de miel tratada a 15 kGy (1738 ± 59.10 , $p < 0.001$) y 20 kGy (1906 ± 84.91 , $p < 0.001$) *versus* la dosis de 0 kGy (1428 ± 68.25) (Figura 5d).

Adicionalmente, el contenido antioxidante analizado con el ensayo de DPPH mostró un efecto favorable dependiente del incremento de la dosis de radiación gamma comparado con miel no irradiada en términos de equivalentes de ácido ascórbico (Figura 5e). Por otra parte, la actividad de eliminación de DPPH incrementó sus valores de forma significativa desde $32.98 \pm 4.05 \%$ en miel no tratada hasta un $41.71 \pm 5.66 \%$ ($p < 0.001$) y 44.88 ± 3.19 ($p < 0.001$) en miel irradiada a 15 y 20 kGy, respectivamente (Figura 5f).

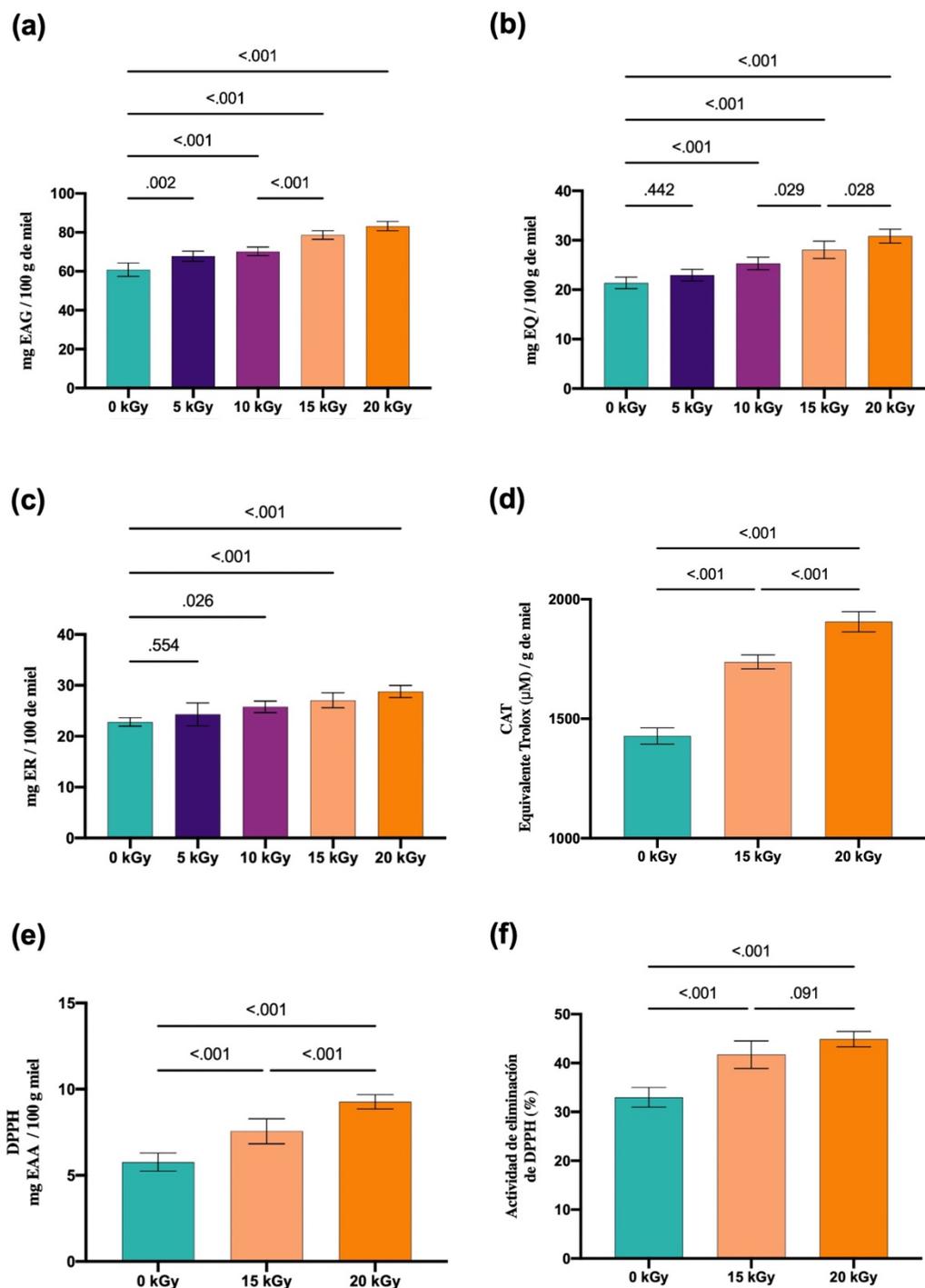


Figura 5. Capacidad antioxidante de la miel de grado médico. (a) Contenido total de fenoles expresado en mg equivalente de ácido gálico por cada 100 g de miel (mg EAG / 100 g de miel). Contenido total de flavonoides en muestras de miel irradiada expresado como mg equivalente de

quercetina (b) y rutina (c) por cada 100 g de muestra (mg EQ / 100 g de miel y (mg ER / 100 g de miel). Los valores de CAT fueron graficados como equivalentes de trolox (d). Ensayo de radical DPPH[·], mg equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA / 100 g de miel) (e) y porcentaje de actividad de eliminación de DPPH[·] (f). CAT: capacidad antioxidante total. Los datos se presentan como medias con desviación estándar.

Generación de un modelo 3D de condrocitos osteoartríticos humanos

Muestras de cartílago articular

En este estudio se incluyeron 15 muestras de cartílago de donantes operados en el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII de las cuales 4 fueron reconstrucciones de ligamento cruzado anterior (RLCA), 4 RLCA más meniscectomía parcial, 1 RLCA más fijación de menisco lateral y 6 reemplazos totales de rodilla. Todos los pacientes fueron operados de la forma habitual y recibieron el mismo tipo de anestesia (bloqueo espinal).

Macroscópicamente, las muestras de cartílago mostraron una superficie lisa e intacta con una coloración blanca – aperlada. Sin datos de fragmentación, calcificación y/o daño por algún instrumento de corte o de radiofrecuencia.

Características antropométricas de los donantes de cartílago

Se analizó el impacto de la edad, índice de masa corporal, sexo y la estratificación con relación al tipo de cultivo celular llevado en condiciones de normoxia o hipoxia. Como se muestra en la tabla 4, no hubo diferencia significativa en características

antropométricas como la edad ($p = 0.16$), índice de masa corporal ($p = 0.33$), género ($p = 0.59$), ni en el procedimiento quirúrgico ($p = 0.71$).

Tabla 4. Características antropométricas de los donadores de cartílago.

Características	Total (n = 15)	Normoxia (n = 5)	Hipoxia (n = 10)	P
Edad, años	43 ± 15	36 ± 11	47 ± 15	0.16
IMC	26.6 ± 4.1	25.1 ± 4.8	27.4 ± 3.8	0.33
Género **				
Masculino	11 (73%)	4 (80%)	7 (70%)	0.59
Procedimiento **				
RTR	9 (60%)	3 (60%)	6 (60%)	0.71
AR	6 (40%)	2 (40%)	4 (40%)	

IMC - índice de masa corporal, RTR - reemplazo total de rodilla, AR - artroscopía de rodilla.

** Prueba de Fisher. Para edad e IMC, se realizó la prueba *t* de *student*.

Caracterización de marcadores de la MEC del cartílago de donantes

Se analizaron marcadores condrogénicos SOX-9, ACAN y COL-2, así como el marcador osteogénico, COL-1, mediante inmunofluorescencia en muestras de cartílago de pacientes (Figura 6). Se observó una notable acumulación pericelular de ACAN y COL-1, así como una amplia distribución en la MEC en las diversas muestras de los donadores. Asimismo, COL-2 mostró una menor señalización pericelular y distribución en la MEC, comparado con ACAN y COL-1. Con relación al marcador condrogénico SOX-9, este fue colocalizado exclusivamente en el núcleo.

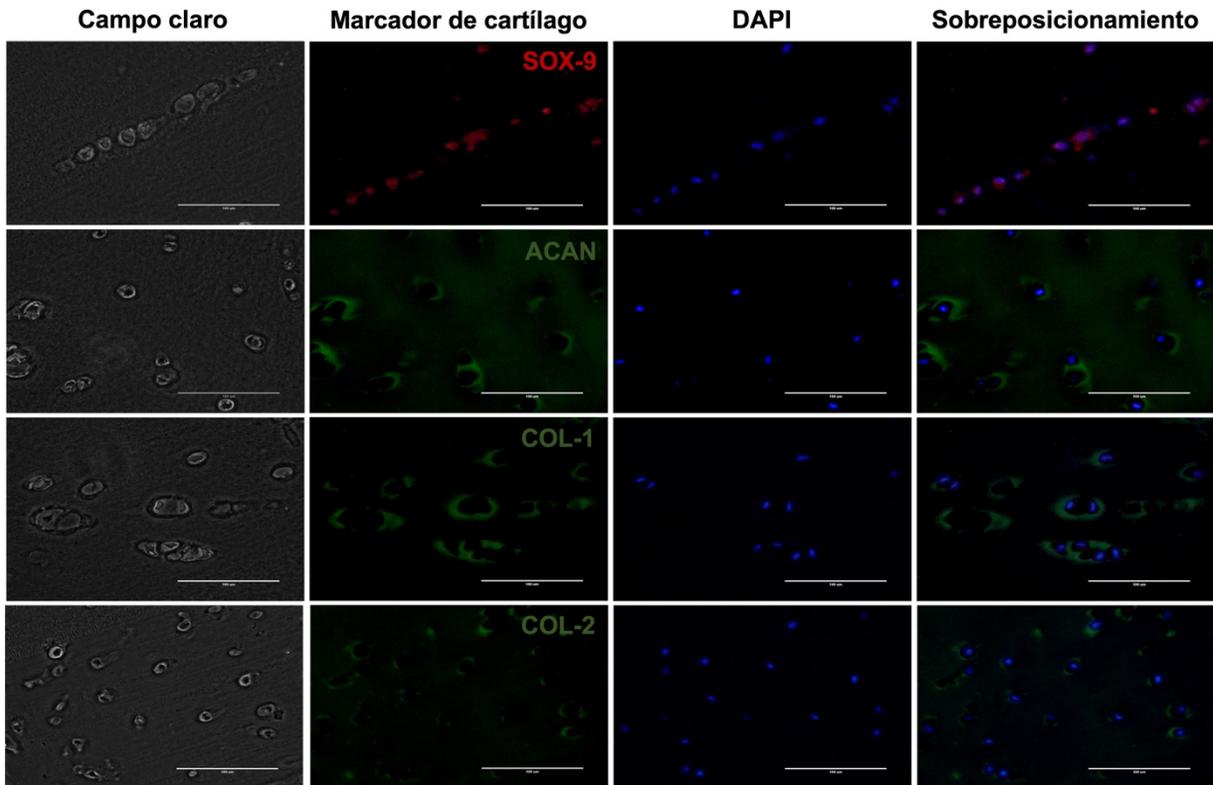


Figura 6. Colocalización de SOX-9, ACAN, COL-1 y COL-2 en muestras de cartílago articular. Con relación a marcadores de la condrogénesis, SOX-9 mostró colocalización nuclear. Por otra parte, COL-2 y ACAN se observaron principalmente en la zona pericelular. Una alta colocalización pericelular de COL-1, proteína relacionada a osteogénesis, fue observada en las muestras. Barra de escala representa 100 μm .

Morfología de los condrocitos articulares en cultivo primario

Se cultivaron condrocitos articulares humanos de biopsia de cartílago en condiciones hipóxicas o normóxicas hasta confluencia del 85-90 % y se designaron como pase 0 (P0). Los condrocitos mostraron una morfología poligonal redondeada en P0 (Figura 7a, b). Sin embargo, en condiciones de normoxia, hubo un cambio progresivo a la morfología tipo fibroblasto a través de los pases (Figura 7b).

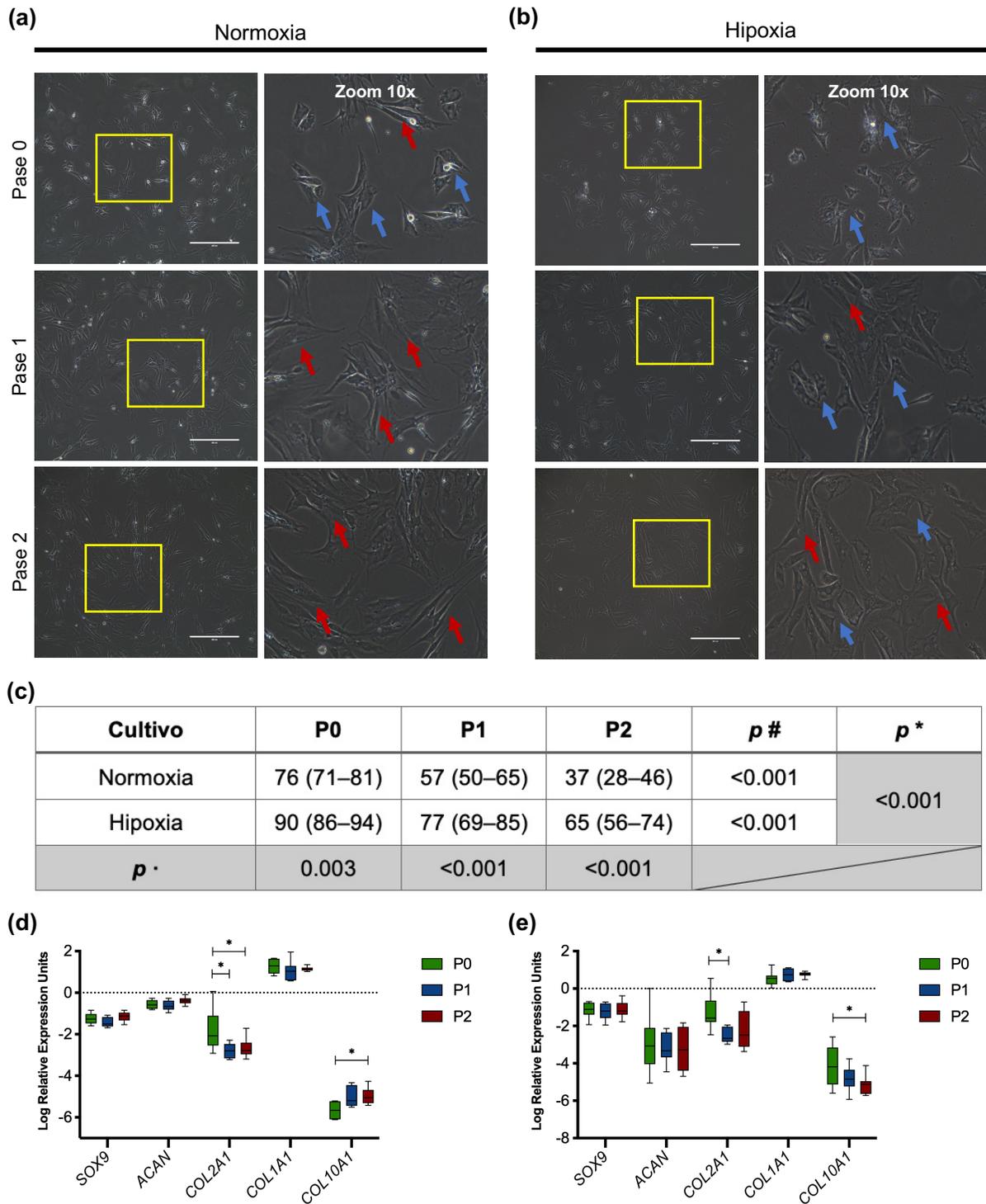


Figura 7. Caracterización del cultivo celular primario de condrocitos articulares. Morfología de células recién aisladas (P0) y condrocitos articulares en P1–P2. Los condrocitos humanos con el

incremento de los pases mostraron características de un fenotipo desdiferenciado que consiste en una morfología fibroblástica. Las flechas azules muestran la morfología de los condrocitos articulares. Las flechas rojas indican una morfología similar a la de los fibroblastos. Las barras de escala representan 400 μm . (a) Condrocitos cultivados en condiciones normóxicas e (b) hipóxicas. (c) Porcentaje de células con morfología nativa del condrocito en cultivo en monocapa. Los datos se expresan como media con intervalo de confianza del 95%. Valor de $p \#$ para el efecto de hipoxia y normoxia durante el cultivo celular, valor de $p \cdot$ para cada pase entre normoxia e hipoxia, y valor de p^* para ANOVA de dos vías. Expresión génica de *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1*, *COL1A1* y *COL10A1* en el cultivo primario de condrocitos en normoxia (d) e hipoxia (e). Expresión normalizada al gen de referencia *RPL27*. Los datos se presentan como mediana con RIC. Diferencias significativas* ($p < 0,05$).

En contraste, en hipoxia, un alto porcentaje de los condrocitos exhibieron en el P2 una morfología poligonal redondeada (Figura 7c). Más aún, se observaron diferencias significativas en el número de células con una morfología nativa del condrocito principalmente en P0 y P1 entre normoxia e hipoxia.

Los condrocitos articulares cultivados en hipoxia presentaron una mayor tasa de crecimiento al alcanzar la confluencia en promedio después de 25 días frente a los 31 días requeridos en normoxia.

Regulación a la baja de genes condrogénicos en condrocitos cultivados

El análisis de expresión génica en el cultivo primario de condrocitos articulares reveló una ligera tendencia al proceso de desdiferenciación. Los cambios en la expresión génica estuvieron marcados principalmente en condiciones de cultivo normóxicas, ya que los niveles de *COL2A1* difirieron significativamente entre P0 (-2.08 RIC (-2.54 —

-1.11)) y P1 (-2.80 RIC (-3.16 — -2.47)) ($p = 0.021$) así como también en P0 frente a P2 (-2.78 RIC (-2.97 — -2.41)) ($p = 0.032$) (Figura 7d). Durante el cultivo *in vitro* en hipoxia, los condrocitos mostraron una expresión disminuida de *COL2A1* sólo entre P0 (-1.58 RIC (-1.79 — -0.64)) y P1 (-2.66 RIC (-2.84 — -2.03)) ($p = 0.022$). En cuanto a la expresión de *SOX9* y *ACAN*, no se encontraron diferencias significativas en el cultivo en monocapa de normoxia vs hipoxia.

Hubo una expresión estable del marcador de fibroblastos *COL1A1* a lo largo de los pases en normoxia e hipoxia. Sin embargo, la expresión de *COL10A1*, un marcador de hipertrofia, mostró niveles disminuidos con el aumento del número de pases en hipoxia (P0 vs. P2, $p = 0.013$) (Figura 7e). Por el contrario, la normoxia ejerció mayores niveles de expresión de *COL10A1* a lo largo del cultivo *in vitro*, siendo estadísticamente significativa en P2 ($p = 0.038$).

Al comparar la expresión relativa del radio *COL2A1/COL1A1*, hubo un aumento de 1.7 veces en el P0 en hipoxia (-1.81 (IC 95% -2.53 — -1.08)) frente a normoxia (-3.15 (IC 95% -3.81 — -2.49)) ($p = 0.007$). Sin embargo, la relación *COL2A1/COL1A1* se redujo claramente a través de los pases en normoxia. Por otro lado, la proporción se mantuvo más alta en los condrocitos cultivados en hipoxia en P2 (-2.88 (IC 95% -3.62 — -2.14)) que aquellos en condiciones normóxicas (-3.76 (IC 95% -4.10 — -3.43)) ($p = 0.020$).

Cabe resaltar que, en condiciones de cultivo hipóxicas en P2 la relación *COL2A1/COL10A1* más alta de 3.25 ((IC 95% 2.66—3.83) $p = 0.012$) en comparación con la normoxia (2.41 (IC 95% 2.07—2.74)). En contraste con la hipoxia, la proporción

de expresión génica de *COL2A1/COL10A1* en condrocitos cultivados en normoxia se redujo al aumentar el tiempo de cultivo.

Desarrollo de esferoides libres de andamio

Morfología del esferoide

Las células se agregaron espontáneamente en las estampas de agarosa y se formaron esferoides de forma regular, manteniendo una circularidad estable durante todo el cultivo. Después de un día de cultivo en hipoxia, se observaron esferoides compactos con superficies lisas; sin embargo, los esferoides generados en normoxia mostraron bordes irregulares haciendo menos estable la circularidad. Por otra parte, se mantuvo un tamaño constante durante todo el cultivo hasta el día 14 en condiciones de hipoxia (143 μm (IC 95% 139 — 145)). Por el contrario, los esferoides se fueron compactando al aumentar el tiempo de cultivo en normoxia, mostrando un diámetro final de 124 μm (IC 95% 120 — 129) al día 14 (Figura 8).

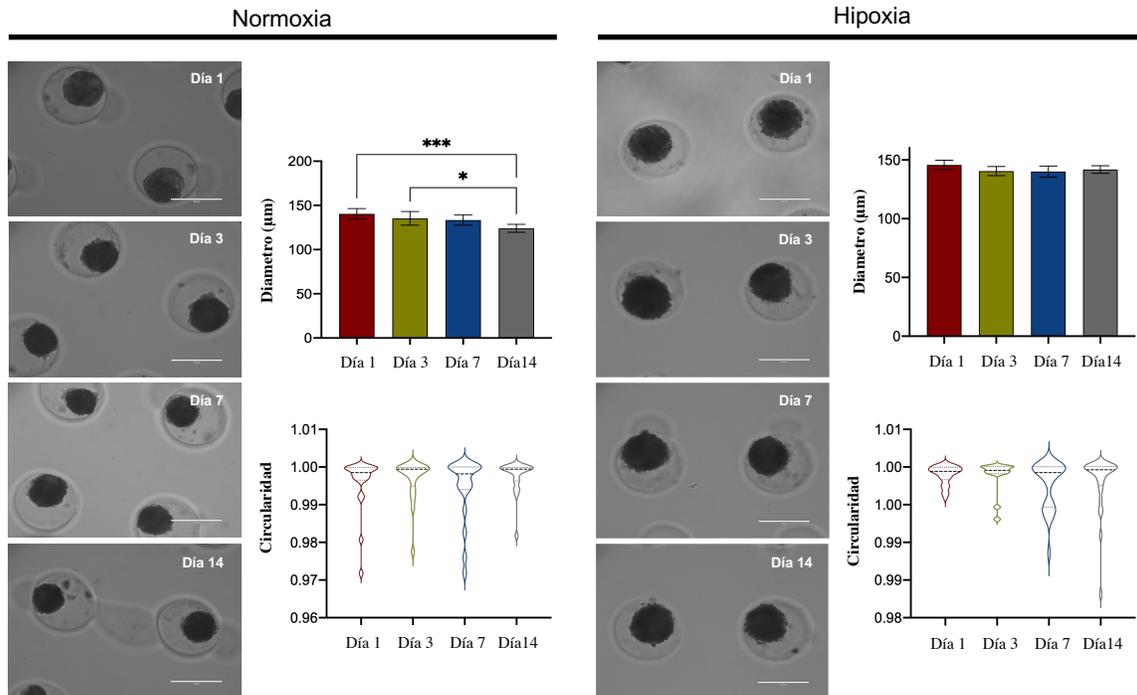


Figura 8. Formación de esferoides libres de andamio a partir de condrocitos humanos. Imágenes de microscopía en campo claro de los esferoides al día 1, 3, 7 y 14. Análisis geométrico de esferoides; medidas de diámetro y circularidad a lo largo de los días de cultivo celular. Cada color representa un día diferente. Los datos se presentan como medianas con RIC para circularidad y media con IC 95% para diámetro. Diferencias significativas * ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$). Barra de escala = 200 μm .

Viabilidad

Después de 14 días de cultivo en condiciones hipóxicas, los esferoides exhibieron un área mínima de células muertas conservando su actividad metabólica (Figura 9a). Sin embargo, se detectó una reducción significativa de la viabilidad celular en esferoides generados en normoxia, mostrando una baja señal de calceína (78.85% (IC 95% 75.27 — 82.44)), pero no en esferoides cultivados en hipoxia (97.49% (IC 95% 96.52 — 98.46)) ($p < 0.001$) (Figura 9b). Las intensidades de calceína y yoduro de propidio se

normalizaron al área del esferoide y se expresaron como un porcentaje de la intensidad relativa de la fluorescencia.

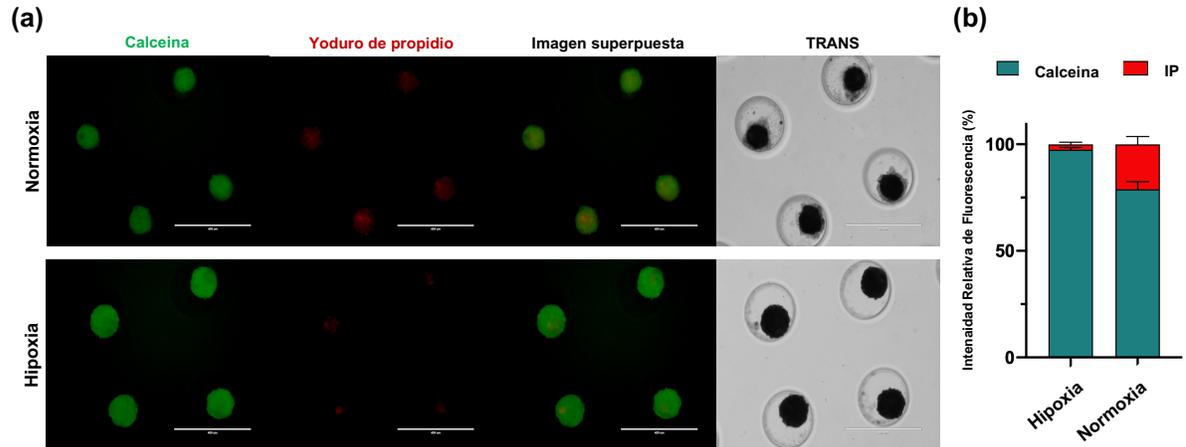


Figura 9. Viabilidad de esferoides cultivados en condiciones de normoxia e hipoxia. La viabilidad se determinó utilizando una tinción con calceína/yoduro de propidio (IP) en el día 14. (a) Los esferoides cultivados en hipoxia poseían una morfología intacta y células viables en el día 14. Barra de escala = 400 μ m. (b) Análisis de fluorescencia de la viabilidad y muerte celular en los esferoides. Los datos se presentan como la media con IC 95%.

Producción de matriz extracelular

Se analizó la producción y distribución de GAGs en esferoides. En el día 14, la tinción con azul alciano mostró los GAGs ampliamente distribuidos en toda el área de los esferoides cultivados en un ambiente hipóxico (Figura 10a).

Para cuantificar las diferencias en la distribución de GAGs entre muestras, determinamos el porcentaje de área teñida con respecto al área total. Se encontraron diferencias significativas entre las condiciones de normoxia ($70.35 \pm 5.97\%$) frente a hipoxia ($91.93 \pm 2.08\%$) ($p < 0.001$). En este contexto, la distribución de GAGs se

conservó independientemente del origen de la muestra cuando se generaron esferoides en condiciones de hipoxia, teniendo como materia prima un total de 10 muestras de cartílago humano de diferentes donadores (Figura 10b). De igual forma, se presentó una homogeneidad en tamaño y circularidad entre los esferoides tras 14 días de cultivo con medio condrogénico en condiciones hipóxicas (Figura 10c, d).

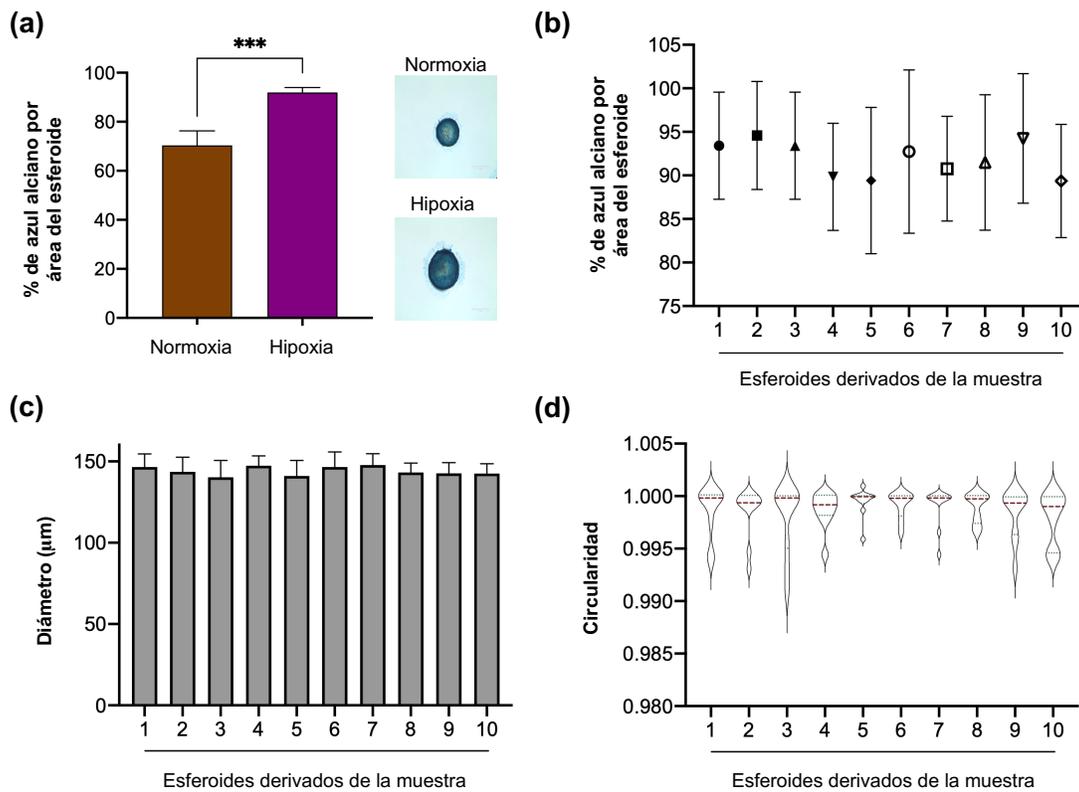


Figura 10. Características geométricas y producción de GAGs en esferoides estratificados por donador. (a) La hipoxia indujo una mayor síntesis de GAGs, un importante componente extracelular de la matriz en los esferoides del cartílago humano. (b) Se observó un porcentaje constante de área teñida de azul con respecto al área total de esferoides por muestra cuando se realizó el cultivo en hipoxia. Los esferoides en hipoxia mantuvieron su (c) diámetro y (d) circularidad independientemente de la fuente de la muestra. Las barras de escala representan 50 µm. Los datos se presentan como media ± SD para a, b y c, y mediana con RIC para circularidad. Diferencia significativa *** ($p < 0.001$).

Perfil de expresión génica

Se evaluó la rediferenciación de condrocitos presentes en los esferoides cultivados en normoxia e hipoxia demostrando el impacto de estas condiciones de cultivo en la regulación de la expresión de genes condrogénicos. Con respecto a los esferoides generados en normoxia, hubo una diferencia significativa en el radio de expresión de *SOX9* (aumento de 2.2 veces, $p < 0.001$) y *COL2A1* (aumento de 1.6 veces, $p < 0.019$), tomando como grupo de referencia a P2; mientras tanto, la expresión de *ACAN* no cambió drásticamente. Además, se observó una mayor expresión de *COL1A1* y *COL10A1* de 5.2 veces ($p < 0.001$) y 9484 veces ($p < 0.001$), respectivamente.

En esferoides generados en hipoxia, *SOX9*, *ACAN* y *COL2A1* aumentaron significativamente su expresión relativa de 6.8 ($p < 0.001$), 257.2 ($p < 0.001$) y 38.1 ($p < 0.001$), respectivamente, frente al cultivo en monocapa en P2. Aunque la hipoxia mostró una alta expresión relativa para *COL1A1* y *COL10A1*, sus niveles fueron más bajos que los esferoides cultivados en normoxia (Figura 11a).

Por otra parte, se comparó la expresión relativa de diferentes genes en esferoides después de 14 días de cultivo comparando hipoxia *versus* normoxia. Los esferoides en condiciones hipóxicas expresaron *SOX9* ($p = 0.006$), *ACAN* ($p = 0.005$), *COL2A1* ($p < 0.001$), *COMP* ($p = 0.015$), *SNAI1* ($p = 0.014$) y *LOXL2* ($p = 0.045$) a tasas más altas que los esferoides generados en normoxia (Figura 11b). Además, la expresión relativa de *COL1A1* aumentó significativamente en normoxia que en hipoxia (1.85 ± 0.19 frente a 1.10 ± 0.27 , $p < 0.001$). Esta tendencia también se observó para *COL10A1* (-0.735 ± 0.40 vs. -1.93 ± 0.86 , $p < 0.001$) (Figura 11b).

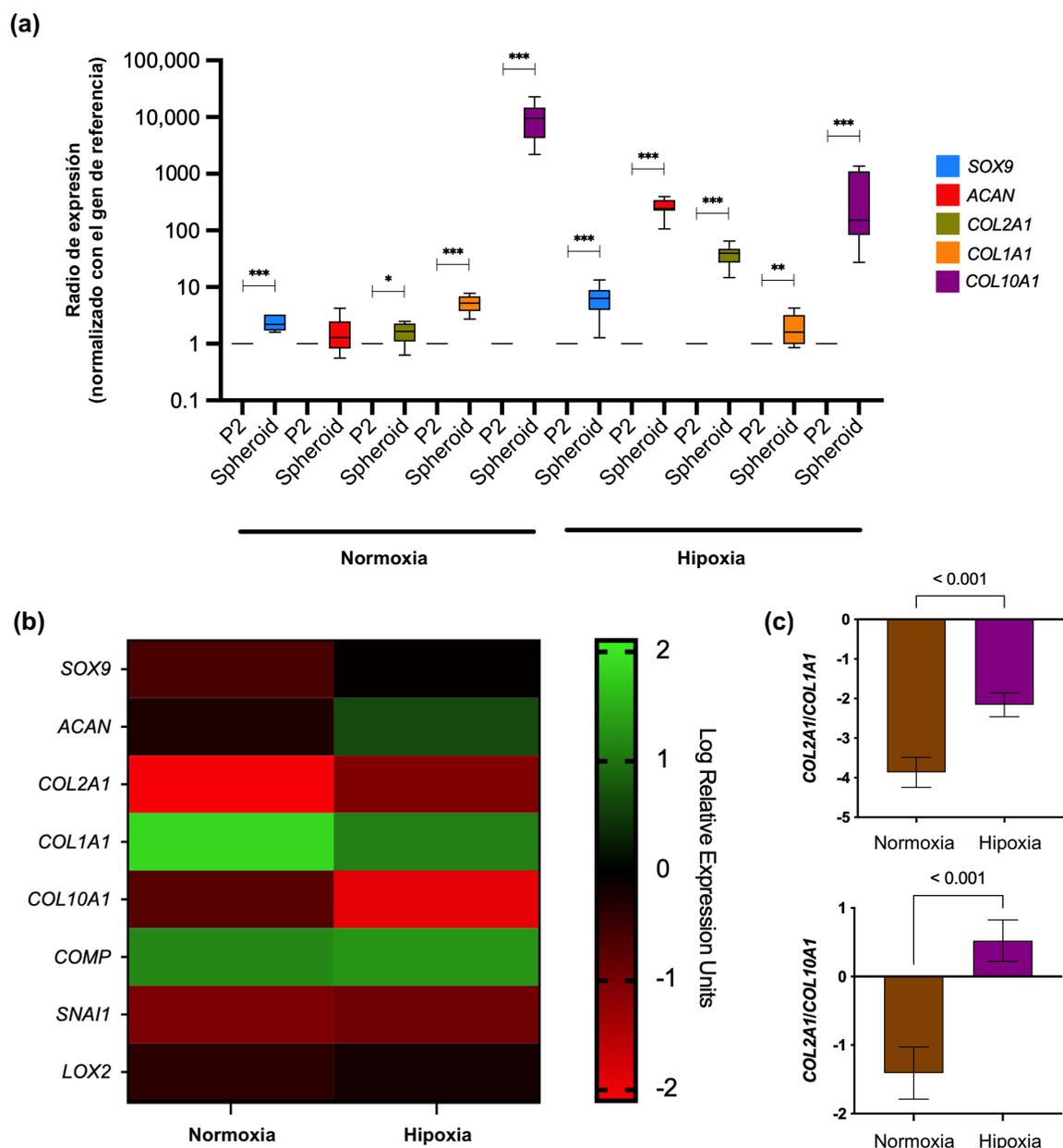


Figura 11. Expresión de genes condrogénicos en esferoides cultivados en condiciones de normoxia e hipoxia. (a) Expresión relativa de marcadores condrogénicos en esferoides después de 14 días de cultivo en medio condrogénico, tomando como grupo de referencia P2. Expresión normalizada con el gen de referencia *RPL27*. Los datos se presentan como mediana con RIC. Diferencias significativas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). (b) Log Unidades de expresión relativa de genes condrogénicos en esferoides libres de andamios generados en ambas condiciones de cultivo. Expresión

normalizada con el gen de referencia *RPL27*. (c) La relación de expresión de *COL2A1/COL1A1* y *COL2A1/COL10A1* en esferoides después de 14 días en condiciones de cultivo hipóxicas o normóxicas. Los datos se presentan como media con IC del 95%.

El ratio de expresión de *COL2A1/COL1A1* en esferoides fue 1.78 veces mayor en hipoxia que en normoxia ($p < 0.001$). Resultados similares se encontraron para el ratio *COL2A1/COL10A1*, donde la hipoxia mostró un ratio de 0.52 (IC 95% 0.21 — 0.82) en comparación con normoxia (-1.41 (IC 95% -1.79 — -1.03)) ($p < 0.001$) (Figura 11c).

Efecto de la miel de grado médico en esferoides de condrocitos humanos

Los esferoides tratados con la dosis 0.5% v/v de miel de grado médico mostraron a las 24h un mayor nivel de intensidad de fluorescencia para calceína (40.83, RIC 35.86 — 43.82) comparado con el control tratado con medio suplementado con SFB al 10% (20.54, RIC 19.01 — 22.37), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.01$) (Figura 12).

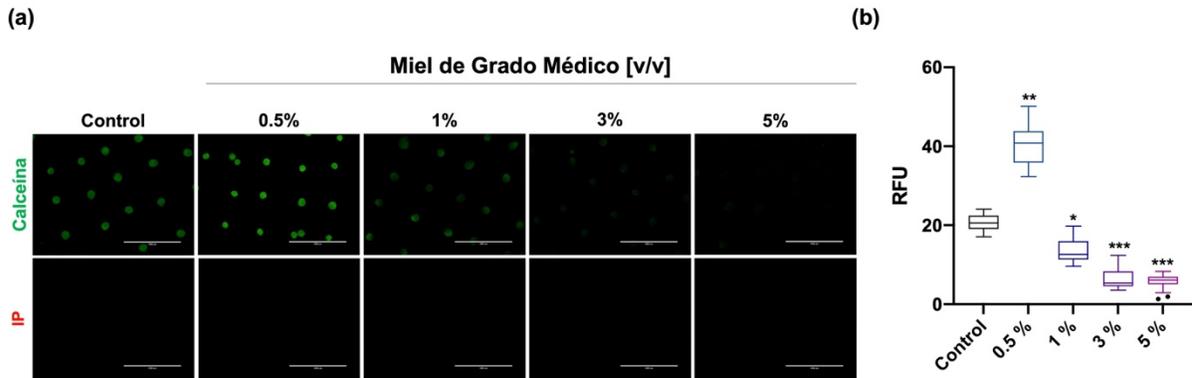


Figura 12. Actividad biológica de la miel de grado médico en esferoides cultivados en un ambiente hipóxico. (a) Tinción de viabilidad celular de esferoides incubados con diferentes concentraciones de miel de grado médico. Dosis más altas al 1% (v/v) disminuyeron la intensidad de fluorescencia para calceína a las 24 h. Las barras de escala representan 1000 μ m. (b) Cuantificación

del área de células vivas en esferoides de cartílago humano (calceína). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ versus control; prueba de Kruskal-Wallis seguida de la comparación por pares de Dunn utilizando el método de Benjamini-Hochberg para el ajuste de comparación múltiple.

Inocuidad de la miel de grado médico en rodilla de rata Wistar

Estudios ecográficos

Las imágenes de ultrasonido mostraron la conservación de la estructura del cartílago articular a lo largo de 21 días con inoculaciones de 1 dosis semanal de miel de grado médico en la articulación de rata (Figura 13). De igual forma, se observa que no existió la presencia de inflamación en la zona articular con ayuda de la señal de poder Doppler.

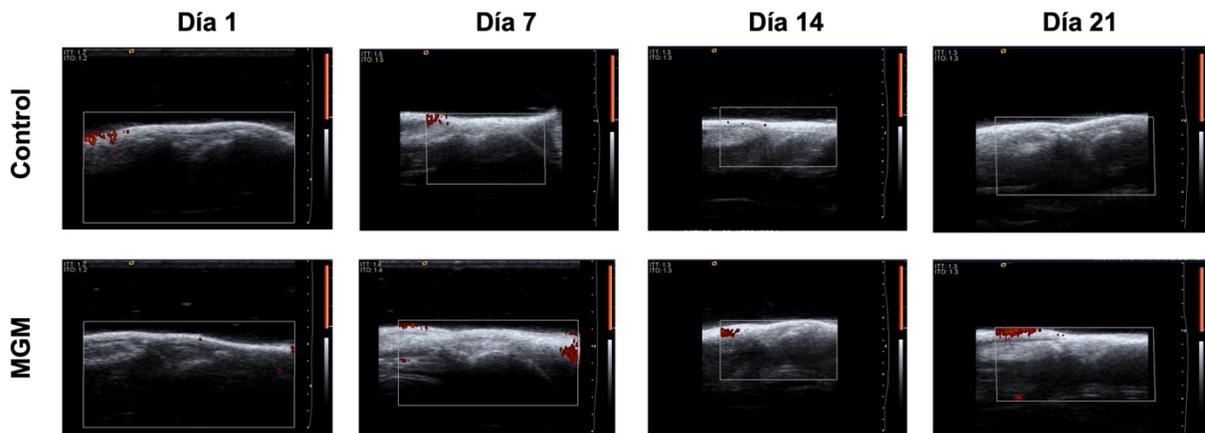


Figura 13. Ultrasonido en vista longitudinal de rodilla de rata Wistar infiltrada con miel de grado médico. La miel no indujo daños inflamatorios ni alteración estructural del cartílago. La señal de poder Doppler no está presente dado que no existió inflamación en zona articular. MGM: miel de grado médico.

Evaluación macroscópica del cartílago articular de rata

El análisis macroscópico evidenció la ausencia de daño al cartílago femoral de ratas inoculadas con miel de grado médico, corroborando lo observado en ecografía. El cartílago presentó una apariencia lisa y brillante con bordes regulares similares a lo observado en muestras de ratas control (Figura 14a).

Asimismo, se descartó la posible influencia del peso sobre un posible impacto en el cartílago femoral a causa del daño biomecánico (Figura 14b). No hay diferencias significativas en los pesos registrados en los días 7, 14 y 21 post viscosuplementación con miel de grado médico. Se registró un peso final en las ratas control de 437 ± 12.7 g comparado con 434 ± 7.57 g en ratas tratadas con miel de grado médico.

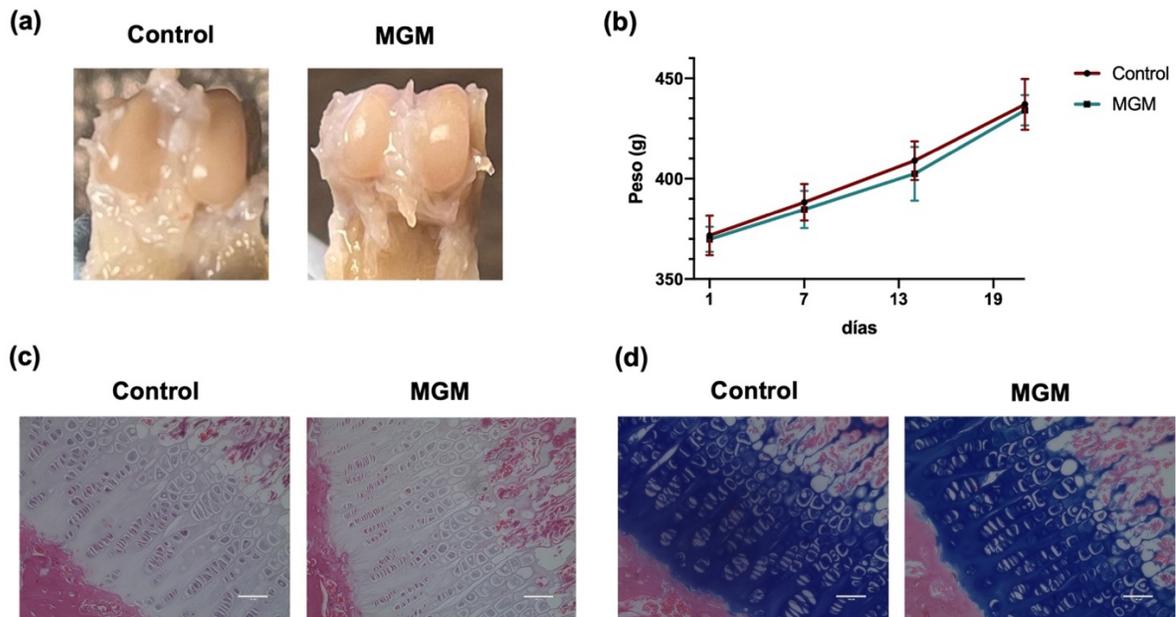


Figura 14. Inocuidad de la viscosuplementación con miel de grado médico vía intraarticular en rodilla de rata Wistar. Características macroscópicas del cartílago femoral (a). Las articulaciones de rata se obtuvieron 21 días después de la infiltración con MGM. No se observó evidencia de daño del cartílago. Imágenes representativas de al menos 5 ratas por grupo. Determinación del peso corporal a

lo largo del estudio (b). Análisis microscópico del cartílago hialino con tinción de hematoxilina-eosina (c) y azul alciano (d). Las barras de escala representan 100 μ m. MGM: miel de grado médico.

Análisis histológico del cartílago articular de rata

En la figura 14c, la tinción de hamatoxilina / eosina muestra una alta densidad de condrocitos con distribución homogénea y abundante matriz en ambos grupos experimentales. De igual forma, se evidencia el tejido óseo subcondral con espacios medulares conteniendo elementos sanguíneos. Por otra parte, se observa que la viscosuplementación con miel de grado médico no afectó el contenido de proteoglicanos evidenciado por la tinción de azul alciano (Figura 14d).

Análisis de biodisponibilidad y efecto hepático de la miel de grado médico en rata Wistar

Compuestos bioactivos de la miel en suero

En la figura 15a, se observan valores similares de fenoles totales en las muestras de suero de ratas control (13.1 ± 0.59 mg EAG / 100 μ L suero) comparado con las ratas tratadas con miel de grado médico (13.2 ± 0.73 mg EAG / 100 μ L suero) ($p = 0.536$).

Micrografía de tejido hepático

No se presentaron alteraciones en el hígado de las ratas tratadas con 3 dosis de miel de grado médico durante 21 días. El análisis histológico en ambos grupos reveló un aspecto normal de los hepatocitos, de forma poligonal, núcleos basófilos y citoplasma eosinófilo (Figura 15b).

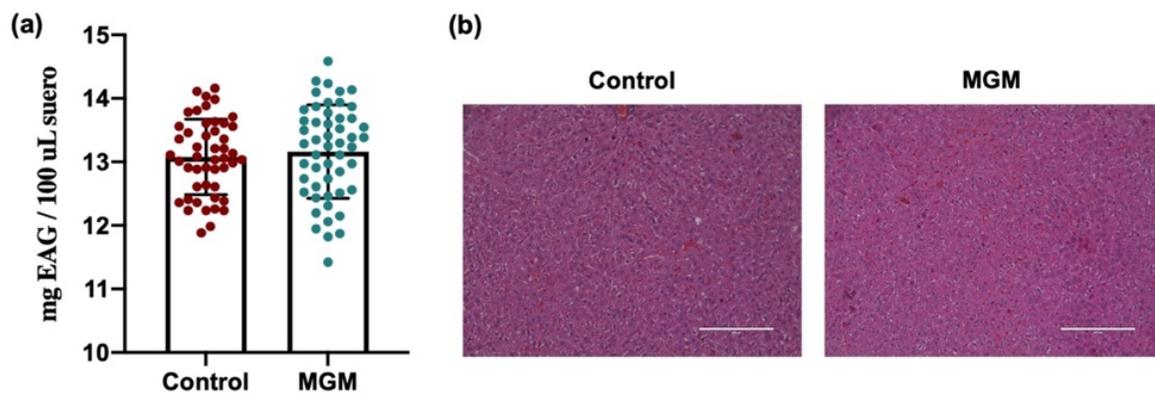


Figura 15. Análisis de biodisponibilidad de compuestos bioactivos de la miel y efecto hepático en ratas control y tratadas con miel de grado médico. (a) Concentración de fenoles totales en suero de rata en el día 21. (b) No existen alteraciones evidentes del tejido hepático mediante tinción de hematoxilina-eosina en cortes histológicos de ratas después de 3 dosis de MGM. Las barras de escala representan 200 μm. MGM: miel de grado médico.

IX. Discusión

Cuando una miel se destina a un uso terapéutico, es necesario asegurarse de que esta cumpla con todos los parámetros de calidad y aplicar tratamientos específicos que garanticen la eliminación de cualquier patógeno que pueda representar un riesgo para la salud de los pacientes. En años recientes se ha acuñado el término miel de grado médico para aquellas mieles que cumplan con las características previamente mencionadas.

La radiación gamma fue explorada como una medida para alcanzar la descontaminación microbiana de la miel de abeja sin aguijón estudiada en este trabajo, dado que ha sido ampliamente establecida como un proceso seguro que no afecta las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de productos derivados de la miel (106, 114, 115). Dado que este proceso se realiza en frío, no ocurren incrementos significativos en la temperatura de la miel irradiada (115, 116). En nuestras muestras de miel tratadas con ^{60}Co se observó un incremento marginal en la temperatura de 25.5 a 27 °C durante el proceso, la cual disminuyó 1 hora después del proceso de radiación al ser almacenadas a temperatura ambiente.

La descontaminación completa de miel de diversos orígenes se ha logrado con dosis de ^{60}Co por arriba de 15 kGy, observándose en algunos casos un incremento en sus propiedades antioxidantes (107, 117, 118, 119). Resultados similares fueron observados en nuestras muestras de miel, teniendo una descontaminación total de microorganismos y esporas a partir de los 15 kGy, así como un aumento en las

propiedades antioxidantes tales como contenido total de fenoles y flavonoides, capacidad antioxidante total y ensayo de DPPH (Tabla 3 y Figura 5).

Previamente se ha reportado un incremento en las propiedades antioxidantes de té, jugo de mango y soja sometidos a diversas dosis de radiación gamma, favoreciendo una elevación en la concentración de fenoles totales (120, 121, 122, 123). El incremento observado en las propiedades antioxidantes en las muestras de miel sometidas a radiación gamma en comparación con la miel no tratada (Figura 5), puede ser atribuido a la liberación de polifenoles ligados a componentes glucosídicos preexistentes en la miel aumentando así la biodisponibilidad de fenoles totales y flavonoides (124, 125). En este sentido, la actividad biológica que presentará la miel estará íntimamente relacionada con el tipo de polifenol y su concentración.

Diferencias en las propiedades biológicas de la miel de abeja sin aguijón han sido reportadas, teniendo un impacto directo la floración, condiciones climáticas, zona geográfica y estación de cosecha sobre su actividad *in vitro* e *in vivo* (126, 127). En cuanto al potencial antioxidante, un estudio realizado por Beristain y colaboradores reporta el contenido total de fenoles entre 25.85 a 40.1 mg EAG / 100 g y 15.65 a 19.04 % de actividad de eliminación de DPPH en muestra de miel de abeja sin aguijón (128). Estos valores son muy similares a los que obtuvimos en miel no irradiada, sin embargo, aquellos obtenidos en miel irradiada a 20 kGy llegaron a tener un incremento aún mayor de hasta 2.07 veces (Figura 5a).

Los compuestos fenólicos caracterizados en la miel de abeja poseen, además de actividad antioxidante, propiedades condroprotectoras. Entre ellos se encuentra quercetina, apigenina, galangina y luteolina que ya han sido reportados en miel de

abeja *Melipona beechei* (125, 127, 129). Esto fundamenta el hecho de evaluar la miel de grado médico como una posible terapia adyuvante para el tratamiento de la osteoartritis en modelos *in vitro* e *in vivo*.

En este sentido, desarrollamos un modelo 3D en cultivo hipóxico que funcionó para la evaluación del efecto de la miel de grado médico. Este trabajo destaca el uso de condrocitos articulares derivados de donantes osteoarthríticos como material de partida para generar esferoides libres de andamios en condiciones hipóxicas y así promover la expresión génica característica del cartílago nativo.

La expansión *in vitro* de condrocitos humanos en un ambiente que mimetice el entorno fisiológico del cartílago, es esencial para analizar el efecto de tratamientos actuales y para explorar nuevas terapias. Sin embargo, los cultivos 3D también representan una oportunidad para evaluar el desarrollo, la progresión y tratamiento de patologías articulares como la OA en etapas tempranas (130). Sin embargo, no hay consenso sobre el modelo *in vitro* ideal que represente las características particulares de la OA debido a los diferentes mecanismos para inducir un metabolismo catabólico en los condrocitos. Nuestros datos respaldan la generación de esferoides de condrocitos humanos con una distribución homogénea de GAG que se asemeja al tejido utilizando un método de cultivo 3D de bajo costo.

Para la generación de esferoides, en nuestro estudio utilizamos células primarias con cierto grado de desdiferenciación y alteración fenotípica debido a la sensibilización y ambiente inflamatorio del que proceden las biopsias. Los cambios de morfología observados en los condrocitos en los primeros pases se han reportado previamente. El fenómeno de desdiferenciación ocurre debido a que se las células crecen en un

entorno 2D donde no existen gradientes de nutrientes y oxígeno que mimeticen el ambiente articular (131, 132). En este sentido, los condrocitos son propensos a adquirir un fenotipo similar a los fibroblastos asociado con una expresión génica alterada de *SOX9*, *COL2A1* y *ACAN* (133, 134). En esta investigación utilizamos condrocitos en P2 para evitar una marcada desdiferenciación celular en el cultivo en monocapa bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Nuestro cultivo 2D mostró una expresión alterada del marcador condrogénico, *COL2A1*, siendo más afectada en condrocitos cultivados en normoxia (Figura 7d). Esto representa un gran inconveniente para el cultivo *in vitro* de condrocitos ya que, a su vez, la relación disminuida de *COL2A1/COL1A1* indica desdiferenciación del condrocito. En nuestro estudio observamos una disminución significativa en la relación *COL2A1/COL1A1* con pases secuenciales en condiciones normóxicas incluso cuando la expresión de *COL1A1* no se alteró (Figura 7d). Sin embargo, la relación *COL2A1/COL1A1* fue estable en condrocitos cultivados en hipoxia, ya que *COL1A1* mostró una expresión más baja y *COL2A1* se vio menos afectado (Figura 7e).

Cabe resaltar que permitir la proliferación de condrocitos hasta alcanzar la confluencia puede explicar la expresión génica constante de *SOX9* y *ACAN* observada en células del P0 comparado con los pases en cultivo hipóxico y normóxico en nuestro estudio. Diferentes reportes han informado que la expresión de genes condrogénicos disminuye al realizar el primer pase comparado con condrocitos recién aislados de donantes humanos y animales de laboratorio (135, 136). Sin embargo, se mantiene una expresión constante de estos genes únicamente durante la expansión de los condrocitos en pases tempranos (132, 135, 136). No obstante, se han registrado

cambios importantes en la expresión de *SOX9* tras el pase 6, mientras que *COL2A1* disminuye progresivamente en los primeros pases de condrocitos articulares humanos, lo que conlleva a una pérdida progresiva del fenotipo condrogénico (132, 136).

Por otro lado, el cultivo prolongado de condrocitos en monocapa desencadena el desarrollo de fibrocondrocitos asociados con un desequilibrio en la homeostasis articular asociada a senescencia (137, 138, 139). Los condrocitos cultivados en condiciones hipóxicas mostraron una disminución significativa en la expresión de *COL10A1*, un marcador de hipertrofia de condrocitos; sin embargo, la normoxia promovió una mayor expresión resultando en una relación *COL2A1/COL10A1* alterada. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que reflejan la desdiferenciación de los condrocitos cultivados en condiciones de normoxia (137, 140, 141).

El cultivo de condrocitos en un entorno 3D se ha propuesto ampliamente como un enfoque prometedor, ya que puede imitar la señalización articular nativa mediante el restablecimiento de un fenotipo específico y funciones celulares del cartílago en comparación con otros métodos reportados previamente que no están relacionados con la generación de esferoides (142, 143, 144). Particularmente, un modelo 3D desencadena un fenotipo específico de tejido debido a las interacciones célula-célula y célula-MEC. La rediferenciación de las células tras un número de pases se ha demostrado en diversos estudios logrando una mayor expresión de *COL2A1* y *ACAN* en cultivos 3D con andamios frente a cultivos 2D (145, 146, 147, 148). En nuestro estudio, el análisis de la expresión génica en esferoides libres de andamio se comparó con el cultivo en monocapa en P2 confirmando un proceso de rediferenciación ejercido

principalmente en condiciones hipóxicas. Como se muestra en la Figura 10a, *SOX9*, *ACAN* y *COL2A1* están sobre expresados en hipoxia. Sin embargo, no se presentó un cambio en la expresión de *ACAN* cuando los esferoides se generaron en normoxia. Este perfil de expresión es similar a lo informado en estudios previos, en donde realizaron cultivo de condrocitos en pellet y esferoides libres de andamio en condiciones de hipoxia y normoxia (149, 150, 151, 152)

Cabe señalar que los esferoides generados en hipoxia modularon la expresión de *COL10A1*, un marcador relacionado con cartílago hipertrófico. No obstante, se ha identificado una elevada expresión de genes hipertróficos durante la rediferenciación de condrocitos independientemente de su origen y del método de cultivo *in vitro* (150, 153, 154). Una expresión elevada de *COL10A1* en esferoides cultivados en normoxia era esperada, sin embargo, las condiciones de hipoxia no lograron reprimirla en su totalidad (Figura 11a). No obstante, existió una reducción significativa en la expresión de *COL10A1* comparando esferoides en condiciones hipóxicas *versus* normoxia después de 14 días de cultivo con medio condrogénico (Figura 11b). Se ha demostrado en estudios recientes que el TGF- β , que se encuentra en el medio condrogénico, puede impulsar la diferenciación hipertrófica en los condrocitos al mismo tiempo que actúa como factor de crecimiento transformante durante la diferenciación del cartílago (155, 156, 157, 158).

En este sentido, las diferencias en la relación *COL2A1/COL1A1* y *COL2A1/COL10A1* en esferoides indican que la hipoxia representa un mejor sistema de cultivo para controlar las características nativas de los condrocitos (Figura 11c). Estos resultados representan un éxito en nuestro estudio ya que los condrocitos empleados para la

generación de esferoides mantuvieron un genotipo y función característica a pesar de su origen artrósico. Por otra parte, la limitación en cantidad de muestra y el tiempo para la expansión *in vitro* de los condrocitos representan factores cruciales que deben tenerse en cuenta por su implicación en el desencadenamiento de la desdiferenciación de condrocitos humanos en cultivos primarios.

El uso de cartílago de donantes humanos para el cultivo 3D implica una diversificación del fenotipo en los condrocitos obtenidos debido a los diferentes grados de OA en cada paciente. No obstante, independientemente de las características antropométricas de los donantes reclutados en este estudio, desarrollamos esferoides viables y con un tamaño uniforme a partir de diez muestras de cartílago hialino mediante un sistema de cultivo libre de andamio en condiciones de hipoxia. Esto con el fin de mimetizar el entorno articular y dado que el cartílago es un tejido avascular que sobrevive en un ambiente con baja tensión de oxígeno, se propuso utilizar una concentración de oxígeno del 5% para el cultivo *in vitro* de condrocitos. Dichos parámetros han sido ampliamente reportados en previas investigaciones para el cultivo en hipoxia de diversos linajes celulares (149, 159, 160, 161, 162).

Dado que el gradiente de oxígeno se ha descrito como un factor esencial que regula la viabilidad celular de los esferoides y que se encuentra directamente relacionado con el tamaño de estos, nosotros analizamos ambos parámetros en el día 14 del cultivo. En este contexto, nuestros resultados revelaron que la hipoxia no generó toxicidad en la parte central de nuestro modelo *in vitro* (Figura 9a). Respaldando nuestros datos, diferentes estudios mencionan que la hipoxia juega un papel vital en el crecimiento y la supervivencia de células madre mesenquimales incrustadas en andamios (163, 164),

siendo capaces de regular el anabolismo en un microambiente hipóxico. Aunque la hipoxia representa el mejor escenario para el cultivo 3D de condrocitos o explantes de cartílago, en nuestro estudio también se demostró un desarrollo adecuado de esferoides después de 14 días de cultivo en normoxia combinado con un medio condrogénico (Figura 8). No obstante, los esferoides cultivados en normoxia mostraron áreas con células muertas (Figura 9a). Estos hallazgos concuerdan con un estudio reciente en el que se desarrollaron esferoides de la línea celular ATDC5 utilizando un andamio de polietileno y medio de diferenciación condrogénica. Los esferoides presentaron zonas características de muerte celular después de 14 días de cultivo en normoxia (151). Omelyanenko *et al.* mencionan que existe un aumento significativo en la población de células no viables en esferoides desde el día 7 hasta el día 21 del cultivo en normoxia. Además, la acumulación de componentes específicos de la MEC, como el colágeno tipo II y el agregano, se correlacionó estrechamente de forma negativa con el tiempo de cultivo (165), lo que concuerda con la baja síntesis de GAG observada en nuestros esferoides en normoxia (Figura 10a).

Nuestros resultados muestran que los esferoides cultivados en hipoxia mostraron mejores características geométricas y mayores niveles de GAGs (Figuras 8 y 10). En este contexto, el cultivo 3D en hipoxia produce MEC característica del cartílago, lo que sugiere que nuestro sistema *in vitro* puede regular el fenotipo condrogénico. Por lo tanto, nuestro sistema de cultivo 3D *in vitro* representa un modelo de estudio novedoso para el desarrollo de fármacos modificadores de la enfermedad en OA.

El uso de compuestos naturales para prevenir o atenuar el estrés oxidante e inflamación ha alcanzado una notable atención en años recientes; en este contexto, la

miel representa una alternativa válida, rentable y biocompatible. Teniendo en cuenta su uso emergente en el ámbito médico, exploramos en nuestro modelo *in vitro* 3D y en articulación de rata, la inocuidad de la miel de grado médico que obtuvimos al irradiar con ^{60}Co miel de abeja *Melipona beecheii*.

A consecuencia del alto contenido de polifenoles presentes en la miel irradiada, se determinó el posible efecto citotóxico en los esferoides de condrocitos humanos observándose por un lado una mayor proliferación a dosis bajas y por otro, efectos tóxicos a partir de la dosis 1% v/v (Figura 12). Estos resultados concuerdan con los hallazgos que se han publicado previamente. Minden-Birkenmaier *et al.* realizaron pruebas de toxicidad de miel Manuka utilizando neutrófilos diferenciados HL-60 y establecieron un límite citotóxico entre 3-5% v/v mediante el ensayo mitocondrial MTS con un aumento de la muerte celular dependiente de la concentración de miel y el tiempo (166). Ensayos citotóxicos realizadas con fibroblastos dérmicos, células endoteliales microvasculares y macrófagos de sangre periférica humana mostraron un límite citotóxico con la dosis de 5% v/v de miel Manuka (167), lo cual es muy similar a nuestros resultados usando miel de abeja *Melipona beecheii* de origen mexicano.

Tomando en cuenta estos antecedentes directos del uso de la miel en modelos *in vitro*, procedimos a evaluar la inocuidad de la miel de grado médico en la articulación de rata Wistar. Nuestros resultados no evidenciaron por imagenología efecto tóxico en la articulación de rodilla de rata, así como cambios macroscópicos del cartílago femoral (Figura 13 y 14).

En conjunto, todas nuestras observaciones confirman la hipótesis de que la miel de grado médico posee un alto contenido de moléculas polifenólicas con actividad

antioxidante sin inducir alteraciones en el cartílago articular. Esta investigación brindó información útil para futuras investigaciones sobre el uso de miel de grado médico y su posible actividad en la condrogénesis, reparación de daño articular y regulación de la homeostasis mediante su administración intraarticular (viscosuplementación). Sin embargo, este campo de investigación debe explorarse más a fondo para comprender las vías celulares y la participación de los diversos compuestos de la miel en el ambiente articular.

De igual forma, nuestro modelo 3D de condrocitos humanos podría ser una herramienta para el estudio a mayor profundidad del efecto de la miel en la condrogénesis usando muestras de pacientes y analizando la expresión génica, proteómica y análisis histológico.

X. Conclusiones

Hemos demostrado que es posible obtener miel de grado médico proveniente de abejas sin aguijón y que esta posee propiedades antioxidantes superiores a la miel nativa. Además, nuestro estudio sienta las bases para seguir investigando el uso seguro de la viscosuplementación con miel de grado médico como una opción terapéutica para el proceso degenerativo articular provocado por el estrés inflamatorio y oxidante. Este descubrimiento no solo tiene implicaciones en la medicina regenerativa del cartílago articular, sino que también puede tener un impacto positivo en otras patologías articulares.

Por otra parte, en este estudio hemos desarrollado un modelo 3D de esferoides de condrocitos humanos en hipoxia que imita el microambiente de la articulación de rodilla. Además de permitirnos comprender mejor el mecanismo subyacente a la condrogénesis, este modelo podría abrir nuevas posibilidades en la medicina regenerativa del cartílago articular. Con este enfoque, es posible esclarecer el mecanismo molecular ejercido por los compuestos bioactivos de miel de grado médico en el cartílago hialino articular, lo que puede ser de gran relevancia en el desarrollo de futuras terapias para combatir patologías discapacitantes articulares.

XI. Referencias

1. Prince MJ, Wu F, Guo Y, Gutierrez Robledo LM, O'Donnell M, Sullivan R, et al. The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet*. 2015;385(9967):549-62.
2. Estrella-Castillo DF, Gomez-de-Regil L. Quality of life in Mexican patients with primary neurological or musculoskeletal disabilities. *Disabil Health J*. 2016;9(1):127-33.
3. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012;4(1):15-37.
4. Zhu X, Sang L, Wu D, Rong J, Jiang L. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res*. 2018;13(1):170.
5. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28(1):5-15.
6. Hawker GA, King LK. The Burden of Osteoarthritis in Older Adults. *Clin Geriatr Med*. 2022;38(2):181-92.
7. Primorac D, Molnar V, Rod E, Jelec Z, Cukelj F, Maticic V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes (Basel)*. 2020;11(8).
8. Pelaez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*. 2011;86:3-8.
9. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1659-64.
10. Vega-Morales D, Esquivel-Valerio JA, Vazquez-Fuentes BR, Diaz-Borjon A, Arce-Salinas CA, Alvarez-Hernandez E, et al. Comorbidity burden in terms of disability in patients with osteoarthritis in Mexico. The IMPACTAR registry. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2021;17(8):440-6.
11. Singh P, Marcu KB, Goldring MB, Otero M. Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1442(1):17-34.
12. Martinez-Armenta C, Camacho-Rea MC, Martinez-Nava GA, Espinosa-Velazquez R, Pineda C, Gomez-Quiroz LE, et al. Therapeutic Potential of Bioactive Compounds in Honey for Treating Osteoarthritis. *Front Pharmacol*. 2021;12:642836.
13. Minguzzi M, Cetrullo S, D'Adamo S, Silvestri Y, Flamigni F, Borzi RM. Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturation Arrest, Oxidative Stress, Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3075293.
14. Scharstuhl A, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(12):1095-8.

15. Jimi E, Fei H, Nakatomi C. NF-kappaB Signaling Regulates Physiological and Pathological Chondrogenesis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
16. Morscheid S, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiaroni M, Venkatesan JK. Therapeutic Effects of rAAV-Mediated Concomittant Gene Transfer and Overexpression of TGF-beta and IGF-I on the Chondrogenesis of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10).
17. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019;393(10182):1745-59.
18. Altman RD, Manjoo A, Fierlinger A, Niazi F, Nicholls M. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:321.
19. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(3):363-88.
20. Zhao QH, Lin LP, Guo YX, Zou R, Wang Z, Shi ZP, et al. Matrix metalloproteinase-13, NF-kappaB p65 and interleukin-1beta are associated with the severity of knee osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2020;19(6):3620-6.
21. Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(2):101-13.
22. Lees S, Golub SB, Last K, Zeng W, Jackson DC, Sutton P, et al. Bioactivity in an Aggrecan 32-mer Fragment Is Mediated via Toll-like Receptor 2. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(5):1240-9.
23. Jung YK, Park HR, Cho HJ, Jang JA, Lee EJ, Han MS, et al. Degrading products of chondroitin sulfate can induce hypertrophy-like changes and MMP-13/ADAMTS5 production in chondrocytes. *Sci Rep.* 2019;9(1):15846.
24. Xu YK, Ke Y, Wang B, Lin JH. The role of MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis in chondrocyte degradation and disease progress in knee osteoarthritis. *Biol Res.* 2015;48:64.
25. Shen S, Guo J, Luo Y, Zhang W, Cui Y, Wang Q, et al. Functional proteomics revealed IL-1beta amplifies TNF downstream protein signals in human synoviocytes in a TNF-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;450(1):538-44.
26. Zhang L, Zhang L, Huang Z, Xing R, Li X, Yin S, et al. Increased HIF-1alpha in Knee Osteoarthritis Aggravate Synovial Fibrosis via Fibroblast-Like Synoviocyte Pyroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:6326517.
27. Haraden CA, Huebner JL, Hsueh MF, Li YJ, Kraus VB. Synovial fluid biomarkers associated with osteoarthritis severity reflect macrophage and neutrophil related inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):146.
28. Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(2):139-45.

29. Pazdzior M, Kielczykowska M, Kurzepa J, Luchowska-Kocot D, Kocot J, Musik I. The Oxidative Stress in Knee Osteoarthritis Patients. An Attempt of Evaluation of Possible Compensatory Effects Occurring in the Disease Development. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(5).
30. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(4):576-91.
31. Bai Y, Gong X, Dou C, Cao Z, Dong S. Redox control of chondrocyte differentiation and chondrogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:83-9.
32. Watt FE, Gulati M. New Drug Treatments for Osteoarthritis: What is on the Horizon? *Eur Med J Rheumatol*. 2017;2(1):50-8.
33. Jones IA, Togashi R, Wilson ML, Heckmann N, Vangsness CT, Jr. Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(2):77-90.
34. Saccomano SJ. Osteoarthritis treatment: Decreasing pain, improving mobility. *Nurse Pract*. 2018;43(9):49-55.
35. Almuhareb AM, Alhawassi TM, Alghamdi AA, Omair MA, Alarfaj H, Alarfaj A, et al. Prevalence of complementary and alternative medicine use among rheumatoid arthritis patients in Saudi Arabia. *Saudi Pharm J*. 2019;27(7):939-44.
36. Conrad VJ, Hazan LL, Latorre AJ, Jakubowska A, Kim CMH. Efficacy and Safety of Honey Bee Venom (*Apis mellifera*) Dermal Injections to Treat Osteoarthritis Knee Pain and Physical Disability: A Randomized Controlled Trial. *J Altern Complement Med*. 2019;25(8):845-55.
37. Owoyele BV, Adenekan OT, Soladoye AO. Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in Wistar rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2011;9(4):447-52.
38. Hsieh CY, Li LH, Rao YK, Ju TC, Nai YS, Chen YW, et al. Mechanistic insight into the attenuation of gouty inflammation by Taiwanese green propolis via inhibition of the NLRP3 inflammasome. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):4081-94.
39. Jeong YJ, Shin JM, Bae YS, Cho HJ, Park KK, Choe JY, et al. Melittin has a chondroprotective effect by inhibiting MMP-1 and MMP-8 expressions via blocking NF-kappaB and AP-1 signaling pathway in chondrocytes. *Int Immunopharmacol*. 2015;25(2):400-5.
40. Locatelli M, Macchione N, Ferrante C, Chiavaroli A, Recinella L, Carradori S, et al. Graminex Pollen: Phenolic Pattern, Colorimetric Analysis and Protective Effects in Immortalized Prostate Cells (PC3) and Rat Prostate Challenged with LPS. *Molecules*. 2018;23(5).
41. Al-Hatamleh MAI, Boer JC, Wilson KL, Plebanski M, Mohamud R, Mustafa MZ. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules*. 2020;10(6).
42. Wang Y, Hodge AM, Wluka AE, English DR, Giles GG, O'Sullivan R, et al. Effect of antioxidants on knee cartilage and bone in healthy, middle-aged subjects: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):R66.
43. Yang X, Zhang Q, Gao Z, Yu C, Zhang L. Baicalin alleviates IL-1beta-induced inflammatory injury via down-regulating miR-126 in chondrocytes. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:184-90.

44. Li Y, Yang B, Bai JY, Xia S, Mao M, Li X, et al. The roles of synovial hyperplasia, angiogenesis and osteoclastogenesis in the protective effect of apigenin on collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2019;73:362-9.
45. Orhan IE, Deniz FSS. Natural Products and Extracts as Xantine Oxidase Inhibitors - A Hope for Gout Disease? *Curr Pharm Des.* 2021;27(2):143-58.
46. Yuan K, Zhu Q, Lu Q, Jiang H, Zhu M, Li X, et al. Quercetin alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting neutrophil inflammatory activities. *J Nutr Biochem.* 2020;84:108454.
47. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Battino M. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr Med Chem.* 2013;20(5):621-38.
48. Ciulu M, Spano N, Pilo MI, Sanna G. Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys. *Molecules.* 2016;21(4):451.
49. da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa AC, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2016;196:309-23.
50. Shen S, Wang J, Chen X, Liu T, Zhuo Q, Zhang SQ. Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship. *Food Chem.* 2019;293:169-77.
51. Frydman GH, Olaleye D, Annamalai D, Layne K, Yang I, Kaafarani HMA, et al. Manuka honey microneedles for enhanced wound healing and the prevention and/or treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) surgical site infection. *Sci Rep.* 2020;10(1):13229.
52. Mohammed MEA, Shati AA, Alfaifi MY, Elbehairi SEI, Alshehri MA, Alhag SK, et al. Acacia honey from different altitudes: total phenols and flavonoids, laser-induced fluorescence (LIF) spectra, and anticancer activity. *J Int Med Res.* 2020;48(8):300060520943451.
53. Sahlan M, Rahmawati O, Pratami DK, Raffiudin R, Mukti RR, Hermasyah H. The Effects of stingless bee (*Tetragonula biroi*) honey on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Saudi J Biol Sci.* 2020;27(8):2025-30.
54. Ramli NZ, Chin KY, Zarkasi KA, Ahmad F. The Beneficial Effects of Stingless Bee Honey from *Heterotrigona itama* against Metabolic Changes in Rats Fed with High-Carbohydrate and High-Fat Diet. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(24).
55. Rosli FN, Hazemi MHF, Akbar MA, Basir S, Kassim H, Bunawan H. Stingless Bee Honey: Evaluating Its Antibacterial Activity and Bacterial Diversity. *Insects.* 2020;11(8).
56. Al-Waili NS, Boni NS. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J Med Food.* 2003;6(2):129-33.
57. Chen X, Liu B, Li X, An TT, Zhou Y, Li G, et al. Identification of anti-inflammatory vesicle-like nanoparticles in honey. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(4):e12069.
58. Ahmad NS, Abdul Aziz A, Kong KW, Hamid MSA, Cheong JPG, Hamzah SH. Dose-Response Effect of Tualang Honey on Postprandial Antioxidant Activity and Oxidative Stress in Female Athletes: A Pilot Study. *J Altern Complement Med.* 2017;23(12):989-95.
59. Hills SP, Mitchell P, Wells C, Russell M. Honey Supplementation and Exercise: A Systematic Review. *Nutrients.* 2019;11(7).

60. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Cordero M, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Mazzoni L, et al. Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing. *Journal of Functional Foods*. 2016;25:38-49.
61. Gasparrini M, Afrin S, Forbes-Hernandez TY, Cianciosi D, Reboredo-Rodriguez P, Amici A, et al. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. *Food Chem Toxicol*. 2018;120:578-87.
62. Afrin S, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Cianciosi D, Reboredo-Rodriguez P, Manna PP, et al. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 1: Enhancement of cellular viability, regulation of cellular apoptosis and improvement of mitochondrial functionality. *Food Chem Toxicol*. 2018;121:203-13.
63. Kamaruzzaman MA, Chin KY, Mohd Ramli ES. A Review of Potential Beneficial Effects of Honey on Bone Health. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:8543618.
64. Candiracci M, Piatti E, Dominguez-Barragan M, Garcia-Antras D, Morgado B, Ruano D, et al. Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 2012;60(50):12304-11.
65. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Res*. 2017;9(2):121-7.
66. Liao T, Ding L, Wu P, Zhang L, Li X, Xu B, et al. Chrysin Attenuates the NLRP3 Inflammasome Cascade to Reduce Synovitis and Pain in KOA Rats. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:3015-27.
67. Zheng W, Tao Z, Cai L, Chen C, Zhang C, Wang Q, et al. Chrysin Attenuates IL-1beta-Induced Expression of Inflammatory Mediators by Suppressing NF-kappaB in Human Osteoarthritis Chondrocytes. *Inflammation*. 2017;40(4):1143-54.
68. Fei J, Liang B, Jiang C, Ni H, Wang L. Luteolin inhibits IL-1beta-induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1586-92.
69. Xue J, Ye J, Xia Z, Cheng B. Effect of luteolin on apoptosis, MAPK and JNK signaling pathways in guinea pig chondrocyte with osteoarthritis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2019;65(6):91-5.
70. Hu Y, Gui Z, Zhou Y, Xia L, Lin K, Xu Y. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2019;145:146-60.
71. Zhang C, Yu W, Huang C, Ding Q, Liang C, Wang L, et al. Chrysin protects human osteoarthritis chondrocytes by inhibiting inflammatory mediator expression via HMGB1 suppression. *Mol Med Rep*. 2019;19(2):1222-9.
72. Zheng W, Feng Z, You S, Zhang H, Tao Z, Wang Q, et al. Fisetin inhibits IL-1beta-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017;45:135-47.

73. Zheng W, Zhang H, Jin Y, Wang Q, Chen L, Feng Z, et al. Butein inhibits IL-1beta-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and slows the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017;42:1-10.
74. Kang BJ, Ryu J, Lee CJ, Hwang SC. Luteolin Inhibits the Activity, Secretion and Gene Expression of MMP-3 in Cultured Articular Chondrocytes and Production of MMP-3 in the Rat Knee. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(3):239-45.
75. Lim H, Park H, Kim HP. Effects of flavonoids on matrix metalloproteinase-13 expression of interleukin-1beta-treated articular chondrocytes and their cellular mechanisms: inhibition of c-Fos/AP-1 and JAK/STAT signaling pathways. *J Pharmacol Sci*. 2011;116(2):221-31.
76. Cho C, Kang LJ, Jang D, Jeon J, Lee H, Choi S, et al. Cirsium japonicum var. maackii and apigenin block Hif-2alpha-induced osteoarthritic cartilage destruction. *J Cell Mol Med*. 2019;23(8):5369-79.
77. Park JS, Kim DK, Shin HD, Lee HJ, Jo HS, Jeong JH, et al. Apigenin Regulates Interleukin-1beta-Induced Production of Matrix Metalloproteinase Both in the Knee Joint of Rat and in Primary Cultured Articular Chondrocytes. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016;24(2):163-70.
78. Kellenberger E, Kuhn I, Schuber F, Muller-Steffner H. Flavonoids as inhibitors of human CD38. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(13):3939-42.
79. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110452.
80. Feng K, Chen Z, Pengcheng L, Zhang S, Wang X. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):18192-205.
81. Wei B, Zhang Y, Tang L, Ji Y, Yan C, Zhang X. Protective effects of quercetin against inflammation and oxidative stress in a rabbit model of knee osteoarthritis. *Drug Dev Res*. 2019;80(3):360-7.
82. Crasci L, Cardile V, Longhitano G, Nanfita F, Panico A. Anti-degenerative effect of Apigenin, Luteolin and Quercetin on human keratinocyte and chondrocyte cultures: SAR evaluation. *Drug Res (Stuttg)*. 2018;68(3):132-8.
83. Chen C, Zhang C, Cai L, Xie H, Hu W, Wang T, et al. Baicalin suppresses IL-1beta-induced expression of inflammatory cytokines via blocking NF-kappaB in human osteoarthritis chondrocytes and shows protective effect in mice osteoarthritis models. *Int Immunopharmacol*. 2017;52:218-26.
84. Li Z, Cheng J, Liu J. Baicalin Protects Human OA Chondrocytes Against IL-1beta-Induced Apoptosis and ECM Degradation by Activating Autophagy via MiR-766-3p/AIFM1 Axis. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:2645-55.
85. Pan Y, Chen D, Lu Q, Liu L, Li X, Li Z. Baicalin prevents the apoptosis of endplate chondrocytes by inhibiting the oxidative stress induced by H2O2. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):2985-91.

86. Cao J, Zhang Y, Wang T, Li B. Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in Baicalin Protection on Chondrocytes From Patients With Osteoarthritis. Dose Response. 2018;16(4):1559325818810636.
87. Huang X, Wu H, Wang L, Zheng L, Zhao J. Protective effects of baicalin on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Exp Ther Med*. 2017;13(4):1267-74.
88. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Butein Activates Autophagy Through AMPK/TSC2/ULK1/mTOR Pathway to Inhibit IL-6 Expression in IL-1beta Stimulated Human Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):932-46.
89. Abd El-Malek FF, Yousef AS, El-Assar SA. Hydrogel film loaded with new formula from manuka honey for treatment of chronic wound infections. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;11:171-6.
90. Hixon KR, Bogner SJ, Ronning-Arnesen G, Janowiak BE, Sell SA. Investigating Manuka Honey Antibacterial Properties When Incorporated into Cryogel, Hydrogel, and Electrospun Tissue Engineering Scaffolds. *Gels*. 2019;5(2).
91. Bonifacio MA, Cochis A, Cometa S, Scalzone A, Gentile P, Procino G, et al. Data on the influence of inorganic clays to improve mechanical and healing properties of antibacterial Gellan gum-Manuka honey hydrogels. *Data Brief*. 2020;28:105096.
92. Bonifacio MA, Cometa S, Cochis A, Gentile P, Ferreira AM, Azzimonti B, et al. Antibacterial effectiveness meets improved mechanical properties: Manuka honey/gellan gum composite hydrogels for cartilage repair. *Carbohydr Polym*. 2018;198:462-72.
93. Bonifacio MA, Cochis A, Cometa S, Scalzone A, Gentile P, Procino G, et al. Advances in cartilage repair: The influence of inorganic clays to improve mechanical and healing properties of antibacterial Gellan gum-Manuka honey hydrogels. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;108:110444.
94. El Agrebi N, Tosi S, Wilmart O, Scippo ML, de Graaf DC, Saegerman C. Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Sci Total Environ*. 2020;704:135312.
95. Chiesa LM, Panseri S, Nobile M, Ceriani F, Arioli F. Distribution of POPs, pesticides and antibiotic residues in organic honeys from different production areas. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2018;35(7):1340-55.
96. Bartha S, Taut I, Goji G, Vlad IA, Dinulica F. Heavy Metal Content in Polyfloral Honey and Potential Health Risk. A Case Study of Copsa Mica, Romania. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(5).
97. Bosancic B, Zabic M, Mihajlovic D, Samardzic J, Mirjanic G. Comparative study of toxic heavy metal residues and other properties of honey from different environmental production systems. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(30):38200-11.
98. Barrasso R, Bonerba E, Savarino AE, Ceci E, Bozzo G, Tantillo G. Simultaneous Quantitative Detection of Six Families of Antibiotics in Honey Using A Biochip Multi-Array Technology. *Vet Sci*. 2018;6(1).

99. Nevas M, Hielm S, Lindstrom M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol.* 2002;72(1-2):45-52.
100. Postmes T, van den Bogaard AE, Hazen M. The sterilization of honey with cobalt 60 gamma radiation: a study of honey spiked with spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis*. *Experientia.* 1995;51(9-10):986-9.
101. Grenda T, Grabczak M, Goldsztejn M, Koziel N, Kwiatek K, Pohorecka K, et al. *Clostridium Perfringens* Spores in Polish Honey Samples. *J Vet Res.* 2018;62(3):281-4.
102. Grabowski NT, Klein G. Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(9):1852-62.
103. Nolan VC, Harrison J, Wright JEE, Cox JAG. Clinical Significance of Manuka and Medical-Grade Honey for Antibiotic-Resistant Infections: A Systematic Review. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(11).
104. Holubova A, Chlupacova L, Cetlova L, Cremers NAJ, Pokorna A. Medical-Grade Honey as an Alternative Treatment for Antibiotics in Non-Healing Wounds-A Prospective Case Series. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(8).
105. Molan PC, Allen KL. The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48(11):1206-9.
106. Hussein SZ, Yusoff KM, Makpol S, Mohd Yusof YA. Does gamma irradiation affect physicochemical properties of honey? *Clin Ter.* 2014;165(2):e125-33.
107. Saxena S, Gautam S, Sharma A. Microbial decontamination of honey of Indian origin using gamma radiation and its biochemical and organoleptic properties. *J Food Sci.* 2010;75(1):M19-27.
108. Ranneh Y, Akim AM, Hamid HA, Khazaai H, Fadel A, Mahmoud AM. Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF-kappaB and p38 MAPK. *Nutr Metab (Lond).* 2019;16:15.
109. Biluca FC, da Silva B, Caon T, Mohr ETB, Vieira GN, Gonzaga LV, et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). *Food Res Int.* 2020;129:108756.
110. Zulkhairi Amin FA, Sabri S, Mohammad SM, Ismail M, Chan KW, Ismail N, et al. Therapeutic Properties of Stingless Bee Honey in Comparison with European Bee Honey. *Adv Pharmacol Sci.* 2018;2018:6179596.
111. Sanchez-Garcia S. [Aging and health]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2018;56(Suppl 1):S4-S5.
112. Tran K, Loshak H. Intra-Articular Hyaluronic Acid for Viscosupplementation in Osteoarthritis of the Hand, Shoulder, and Temporomandibular Joint: A Review of Clinical Effectiveness and Safety. *CADTH Rapid Response Reports.* Ottawa (ON)2019.
113. Peck J, Slovek A, Miro P, Vij N, Traube B, Lee C, et al. A Comprehensive Review of Viscosupplementation in Osteoarthritis of the Knee. *Orthop Rev (Pavia).* 2021;13(2):25549.
114. O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC, Olson DG. Impact of irradiation on the safety and quality of poultry and meat products: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008;48(5):442-57.

115. Saxena S, Panicker L, Gautam S. Rheology of Indian Honey: Effect of Temperature and Gamma Radiation. *Int J Food Sci.* 2014;2014:935129.
116. Verde SC, Trigo MJ, Sousa MB, Ferreira A, Ramos AC, Nunes I, et al. Effects of gamma radiation on raspberries: safety and quality issues. *J Toxicol Environ Health A.* 2013;76(4-5):291-303.
117. Khalil MI, Sulaiman SA, Alam N, Moniruzzaman M, Bai'e S, Man CN, et al. Gamma irradiation increases the antioxidant properties of Tualang honey stored under different conditions. *Molecules.* 2012;17(1):674-87.
118. Hussein SZ, Yusoff KM, Makpol S, Yusof YA. Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. *Molecules.* 2011;16(8):6378-95.
119. Mohamed M, Sirajudeen K, Swamy M, Yaacob NS, Sulaiman SA. Studies on the antioxidant properties of Tualang honey of Malaysia. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2009;7(1):59-63.
120. Popovic BM, Stajner D, Mandic A, Canadanovic-Brunet J, Kevresan S. Enhancement of antioxidant and isoflavones concentration in gamma irradiated soybean. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:383574.
121. Naresh K, Varakumar S, Variyar PS, Sharma A, Reddy OV. Enhancing antioxidant activity, microbial and sensory quality of mango (*Mangifera indica* L.) juice by gamma-irradiation and its in vitro radioprotective potential. *J Food Sci Technol.* 2015;52(7):4054-65.
122. Janiak MA, Slavova-Kazakova A, Karamavac M, Kancheva V, Terzieva A, Ivanova I, et al. Effects of Gamma-Irradiation on the Antioxidant Potential of Traditional Bulgarian Teas. *Nat Prod Commun.* 2017;12(2):181-4.
123. Dixit AK, Bhatnagar D, Kumar V, Rani A, Manjaya JG, Bhatnagar D. Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean. *J Agric Food Chem.* 2010;58(7):4298-302.
124. Variyar PS, Limaye A, Sharma A. Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). *J Agric Food Chem.* 2004;52(11):3385-8.
125. Santos ACD, Biluca FC, Braghini F, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Phenolic composition and biological activities of stingless bee honey: An overview based on its aglycone and glycoside compounds. *Food Res Int.* 2021;147:110553.
126. Avila S, Lazzarotto M, Hornung PS, Teixeira GL, Ito VC, Bellettini MB, et al. Influence of stingless bee genus (*Scaptotrigona* and *Melipona*) on the mineral content, physicochemical and microbiological properties of honey. *J Food Sci Technol.* 2019;56(10):4742-8.
127. da SSaR, de Carvalho CAL, Oda-Souza M, de ASB, de SDF. Characterization of honey of stingless bees from the Brazilian semi-arid region. *Food Chem.* 2020;327:127041.
128. Jimenez M, Beristain CI, Azuara E, Mendoza MR, Pascual LA. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of Apicultural Research.* 2016;55(2):151-60.
129. da Silva IA, da Silva TM, Camara CA, Queiroz N, Magnani M, de Novais JS, et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* 2013;141(4):3552-8.

130. Salgado C, Jordan O, Allemann E. Osteoarthritis In Vitro Models: Applications and Implications in Development of Intra-Articular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2021;13(1).
131. Ecke A, Lutter AH, Scholka J, Hansch A, Becker R, Anderer U. Tissue Specific Differentiation of Human Chondrocytes Depends on Cell Microenvironment and Serum Selection. *Cells*. 2019;8(8).
132. Muhammad SA, Nordin N, Hussin P, Mehat MZ, Tan SW, Fakurazi S. Optimization of Protocol for Isolation of Chondrocytes from Human Articular Cartilage. *Cartilage*. 2021;13(2_suppl):872S-84S.
133. Mao Y, Hoffman T, Wu A, Kohn J. An Innovative Laboratory Procedure to Expand Chondrocytes with Reduced Dedifferentiation. *Cartilage*. 2018;9(2):202-11.
134. Stokes DG, Liu G, Coimbra IB, Piera-Velazquez S, Crowl RM, Jimenez SA. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(2):404-19.
135. De Moor L, Beyls E, Declercq H. Scaffold Free Microtissue Formation for Enhanced Cartilage Repair. *Ann Biomed Eng*. 2020;48(1):298-311.
136. Tew SR, Murdoch AD, Rauchenberg RP, Hardingham TE. Cellular methods in cartilage research: primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells. *Methods*. 2008;45(1):2-9.
137. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vecsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(2):286-95.
138. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY, et al. Chondrogenic Potential of MSC from Different Sources in Spheroid Culture. *Bull Exp Biol Med*. 2021;170(4):528-36.
139. Ma B, Leijten JC, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, et al. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(4):599-603.
140. Aurich M, Hofmann GO, Gras F, Rolaufts B. Human osteochondritis dissecans fragment-derived chondrocyte characteristics ex vivo, after monolayer expansion-induced de-differentiation, and after re-differentiation in alginate bead culture. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19(1):168.
141. Chen L, Xu J, Lv S, Zhao Y, Sun D, Zheng Y, et al. Overexpression of long non-coding RNA AP001505.9 inhibits human hyaline chondrocyte dedifferentiation. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(8):11433-54.
142. Gigante A, Bevilacqua C, Cappella M, Manzotti S, Greco F. Engineered articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(8):713-6.
143. Sulaiman S, Chowdhury SR, Fauzi MB, Rani RA, Yahaya NHM, Tabata Y, et al. 3D Culture of MSCs on a Gelatin Microsphere in a Dynamic Culture System Enhances Chondrogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8).

144. Klinder A, Kussauer S, Hiemer B, Wree A, Bader R, Jonitz-Heincke A. Influence of Conditioned Media on the Re-Differentiation Capacity of Human Chondrocytes in 3D Spheroid Cultures. *J Clin Med*. 2020;9(9).
145. Foldager CB, Nielsen AB, Munir S, Ulrich-Vinther M, Soballe K, Bunger C, et al. Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes. *Acta Orthop*. 2011;82(2):234-40.
146. Caron MM, Emans PJ, Coolen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(10):1170-8.
147. Pahoff S, Meinert C, Bas O, Nguyen L, Klein TJ, Hutmacher DW. Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *J Mater Chem B*. 2019;7(10):1761-72.
148. Bianchi VJ, Lee A, Anderson J, Parreno J, Theodoropoulos J, Backstein D, et al. Redifferentiated Chondrocytes in Fibrin Gel for the Repair of Articular Cartilage Lesions. *Am J Sports Med*. 2019;47(10):2348-59.
149. Shi Y, Ma J, Zhang X, Li H, Jiang L, Qin J. Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes. *Integr Biol (Camb)*. 2015;7(3):289-97.
150. Markway BD, Cho H, Johnstone B. Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(4):R92.
151. Ariyoshi W, Usui M, Sano K, Kawano A, Okinaga T, Nakashima K, et al. 3D spheroid culture models for chondrocytes using polyethylene glycol-coated microfabricated chip. *Biomed Res*. 2020;41(4):187-97.
152. Chavez RD, Serra R. Scaffoldless tissue-engineered cartilage for studying transforming growth factor beta-mediated cartilage formation. *Biotechnol Prog*. 2020;36(1):e2897.
153. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjogren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(3):R560-8.
154. Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittlinger M, Lindahl A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R133.
155. Ma K, Zhu B, Wang Z, Cai P, He M, Ye D, et al. Articular chondrocyte-derived extracellular vesicles promote cartilage differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by activation of autophagy. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):163.
156. Deng Y, Lei G, Lin Z, Yang Y, Lin H, Tuan RS. Engineering hyaline cartilage from mesenchymal stem cells with low hypertrophy potential via modulation of culture conditions and Wnt/beta-catenin pathway. *Biomaterials*. 2019;192:569-78.
157. Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM. TGFbeta/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells*. 2019;8(9).
158. Thielen NGM, Neefjes M, Vitters EL, van Beuningen HM, Blom AB, Koenders MI, et al. Identification of Transcription Factors Responsible for a Transforming Growth Factor-beta-Driven Hypertrophy-like Phenotype in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Cells*. 2022;11(7).

159. Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(2):9.
160. Strobel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R34.
161. Buckley CT, Vinardell T, Kelly DJ. Oxygen tension differentially regulates the functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad derived MSCs and articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(10):1345-54.
162. Das RH, van Osch GJ, Kreukniet M, Oostra J, Weinans H, Jahr H. Effects of individual control of pH and hypoxia in chondrocyte culture. *J Orthop Res.* 2010;28(4):537-45.
163. Meyer EG, Buckley CT, Thorpe SD, Kelly DJ. Low oxygen tension is a more potent promoter of chondrogenic differentiation than dynamic compression. *J Biomech.* 2010;43(13):2516-23.
164. Meretoja VV, Dahlin RL, Wright S, Kasper FK, Mikos AG. The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. *Biomaterials.* 2013;34(17):4266-73.
165. Omelyanenko NP, Karalkin PA, Bulanova EA, Koudan EV, Parfenov VA, Rodionov SA, et al. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation In Vitro. *Cartilage.* 2020;11(4):521-31.
166. Minden-Birkenmaier BA, Cherukuri K, Smith RA, Radic MZ, Bowlin GL. Manuka Honey Modulates the Inflammatory Behavior of a dHL-60 Neutrophil Model under the Cytotoxic Limit. *Int J Biomater.* 2019;2019:6132581.
167. Sell SA, Wolfe PS, Spence AJ, Rodriguez IA, McCool JM, Petrella RL, et al. A preliminary study on the potential of manuka honey and platelet-rich plasma in wound healing. *Int J Biomater.* 2012;2012:313781.

XII. Anexos

Artículo original

The Critical Role of Hypoxia in the Re-Differentiation of Human Articular Chondrocytes

Carlos Martínez-Armenta^{1,2}, Carlos Suarez-Ahedo³, Anell Olivos-Meza⁴, María C Camacho-Rea⁵, Laura E Martínez-Gómez², Guadalupe Elizabeth Jimenez-Gutierrez², Gabriela A Martínez-Nava², Luis E Gomez-Quiroz⁶, Carlos Pineda⁷, Alberto López-Reyes²

¹Graduate Program in Experimental Biology, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico.

²Laboratorio de Gerociencias, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Mexico City 14389, Mexico.

³Departamento de Reconstrucción Articular, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Mexico City 14389, Mexico.

⁴Servicio de Medicina del Deporte y Ortopedia, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Mexico City 14389, Mexico.

⁵Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaria de Salud, Mexico City 14080, Mexico.

⁶Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico.

⁷Dirección General, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Mexico City 14389, Mexico.

Cells. 2022 Aug 17;11(16):2553.

PMID: 36010629 PMCID: PMC9406483 DOI: 10.3390/cells11162553

Article

The Critical Role of Hypoxia in the Re-Differentiation of Human Articular Chondrocytes

Carlos Martínez-Armenta ^{1,2} , Carlos Suarez-Ahedo ³, Anell Olivos-Meza ⁴ , María C. Camacho-Rea ⁵, Laura E. Martínez-Gómez ² , Guadalupe Elizabeth Jimenez-Gutierrez ² , Gabriela A. Martínez-Nava ² , Luis E. Gomez-Quiroz ⁶ , Carlos Pineda ⁷ and Alberto López-Reyes ^{2,*} 

- ¹ Graduate Program in Experimental Biology, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico
 - ² Laboratorio de Gerociencias, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City 14389, Mexico
 - ³ Departamento de Reconstrucción Articular, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City 14389, Mexico
 - ⁴ Servicio de Medicina del Deporte y Ortopedia, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City 14389, Mexico
 - ⁵ Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaría de Salud, Mexico City 14080, Mexico
 - ⁶ Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico
 - ⁷ Dirección General, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City 14389, Mexico
- * Correspondence: alloreya@yahoo.com; Tel.: +52-5580234477



Citation: Martínez-Armenta, C.; Suarez-Ahedo, C.; Olivos-Meza, A.; Camacho-Rea, M.C.; Martínez-Gómez, L.E.; Jimenez-Gutierrez, G.E.; Martínez-Nava, G.A.; Gomez-Quiroz, L.E.; Pineda, C.; López-Reyes, A. The Critical Role of Hypoxia in the Re-Differentiation of Human Articular Chondrocytes. *Cells* **2022**, *11*, 2553. <https://doi.org/10.3390/cells11162553>

Academic Editor: Jennifer H. Jonason

Received: 1 June 2022
Accepted: 7 August 2022
Published: 17 August 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The preservation of the chondrogenic phenotype and hypoxia-related physiological microenvironment are major challenges in the 2D culture of primary human chondrocytes. To address this problem, we develop a 3D culture system generating scaffold-free spheroids from human chondrocytes. Our results highlight the chondrogenic potential of cultured human articular chondrocytes in a 3D system combined with hypoxia independently of the cartilage source. After 14 days of culture, we developed spheroids with homogenous diameter and shape from hyaline cartilage donors. Spheroids generated in hypoxia showed a significantly increased glycosaminoglycans synthesis and up-regulated the expression of *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1*, *COMP*, and *SNAIL* compared to those obtained under normoxic conditions. Therefore, we conclude that spheroids developed under hypoxic conditions modulate the expression of chondrogenesis-related genes and native tissue features better than 2D cultures. Thus, this scaffold-free 3D culture system represents a novel in vitro model that can be used for cartilage biology research.

Keywords: chondrocyte; hypoxia; cartilage; re-differentiation; 3D cell culture

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease associated with cartilage damage, synovitis, and altered bone remodeling [1]. Globally, OA is the most prevalent chronic joint disease, causing motor disability in the elderly where the quality of life is detrimentally affected [2,3]. Moreover, its adverse impact on health systems and economies will persist with the worldwide aging population. For decades, there has been a relentless struggle to find bioactive molecules for cartilage tissue engineering and to treat the early stages of OA that could decrease its progression in the long term. However, one of the challenges we face is designing in vitro models that mimic intra-articular conditions, making the translation of new drugs to humans highly complex.

Three-dimensional (3D) culture of chondrocytes and hypoxic conditions has been proposed as novel approaches to assay cartilage repair treatments [4–7]. These insightful culture methods provide an attractive option to mimic the tissue microenvironment

Artículo de revisión

Therapeutic Potential of Bioactive Compounds in Honey for Treating Osteoarthritis

Carlos Martínez-Armenta¹, María Carmen Camacho-Rea², Gabriela Angélica Martínez-Nava³, Rocio Espinosa-Velázquez⁴, Carlos Pineda⁵, Luis Enrique Gomez-Quiroz⁶, Alberto López-Reyes^{4,7}

¹Posgrado en Biología Experimental, Dirección de Ciencias Biológicas y de La Salud (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico.

²Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico.

³Laboratorio de Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, Mexico.

⁴Facultad de Ciencias de La Salud, Universidad Anáhuac México Sur, Ciudad de México, Mexico.

⁵División de Enfermedades Musculo-esqueléticas y Reumáticas, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, Mexico.

⁶Área de Medicina Experimental y Traslacional, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico.

⁷Laboratorio de Gerociencias, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, Mexico.

Front Pharmacol. 2021 Apr 21;12:642836.

PMID: 33967778 PMCID: PMC8097136 DOI: 10.3389/fphar.2021.642836



Therapeutic Potential of Bioactive Compounds in Honey for Treating Osteoarthritis

Carlos Martínez-Armenta¹, María Carmen Camacho-Rea², Gabriela Angélica Martínez-Nava³, Rocio Espinosa-Velázquez⁴, Carlos Pineda⁵, Luis Enrique Gomez-Quiroz⁶ and Alberto López-Reyes^{4,7*}

¹Posgrado en Biología Experimental, Dirección de Ciencias Biológicas y de La Salud (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico, ²Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico, ³Laboratorio de Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, Mexico, ⁴Facultad de Ciencias de La Salud, Universidad Anáhuac México Sur, Ciudad de México, Mexico, ⁵División de Enfermedades Musculo-esqueléticas y Reumáticas, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, Mexico, ⁶Área de Medicina Experimental y Traslacional, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico, ⁷Laboratorio de Gerociencias, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Yibin Feng,
The University of Hong Kong,
Hong Kong

Reviewed by:

Simone Carradori,
University "G. d'Annunzio" of Chieti-
Pescara, Italy
Petya Dimitrova,
Bulgarian Academy of Sciences,
Bulgaria

*Correspondence:

Alberto López-Reyes
allorej@yahoo.com

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 04 January 2021

Accepted: 06 April 2021

Published: 21 April 2021

Citation:

Martínez-Armenta C,
Camacho-Rea MC,
Martínez-Nava GA,
Espinosa-Velázquez R, Pineda C,
Gomez-Quiroz LE and López-Reyes A
(2021) Therapeutic Potential of
Bioactive Compounds in Honey for
Treating Osteoarthritis.
Front. Pharmacol. 12:642836.
doi: 10.3389/fphar.2021.642836

Dysregulation of joint tissue homeostasis induces articular degenerative changes and musculoskeletal diseases such as osteoarthritis. This pathology represents the first cause of motor disability in individuals over 60 years of age, impacting their quality of life and the costs of health systems. Nowadays, pharmacological treatments for cartilage disease have failed to achieve full tissue regeneration, resulting in a functional loss of the joint; therefore, joint arthroplasty is the gold standard procedure to cure this pathology in severe cases of Osteoarthritis. A different treatment is the use of anti-inflammatory drugs which mitigate pain and inflammation in some degree, but without significant inhibition of disease progression. In this sense, new therapeutic alternatives based on natural compounds have been proposed to delay osteoarthritis progression, particularly those agents that regulate articular homeostasis. Preclinical studies have shown a therapeutic application of honey and its bioactive compounds, ranging from treating wounds, coughs, skin infections, and are also used as a biological stimulant by exerting antioxidant and anti-inflammatory properties. In this article, we reviewed the current medicinal applications of honey with particular emphasis on its use regulating articular homeostasis by inhibiting inflammation and oxidative stress.

Keywords: Articular homeostasis, osteoarthritis, inflammation, honey flavonoids, Redox homeostasis, cartilage, chondroprotective activity

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is a disabling condition characterized by joint degeneration; it is related to different etiological factors such as aging, genetics, metabolic and biomechanical stress. In this context, inflammation and oxidative stress play a pivotal role in the progressive deterioration of joint tissues including articular cartilage (AC), subchondral bone, synovial membrane and meniscus that maintain the functionality of joints until an exacerbated homeostatic dysfunction occurs (Minguzzi et al., 2018). Despite the clinical relevance of OA, which affects

Artículos en colaboración durante el Doctorado

Martínez-Gómez LE, **Martinez-Armenta C**, Medina-Luna D, Ordoñez-Sánchez ML, Tusie-Luna T, Ortega-Peña S, Herrera-López B, Suarez-Ahedo C, Jimenez-Gutierrez GE, Hidalgo-Bravo A, Vázquez-Cárdenas P, Vidal-Vázquez RP, Ramírez-Hinojosa JP, Martinez Matsumoto PM, Vargas-Alarcón G, Posadas-Sánchez R, Fragoso JM, Martínez-Ruiz FJ, Zayago-Angeles DM, Mata-Miranda MM, Vázquez-Zapién GJ, Martínez-Cuazitl A, Andrade-Alvarado J, Granados J, Ramos-Tavera L, Camacho-Rea MDC, Segura-Kato Y, Rodríguez-Pérez JM, Coronado-Zarco R, Franco-Cendejas R, López-Jácome LE, Magaña JJ, Vela-Amieva M, Pineda C, Martínez-Nava GA, López-Reyes A. Implication of myddosome complex genetic variants in outcome severity of COVID-19 patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2023 Jun 16:S1684-1182(23)00116-0.

Martínez-Nava GA, Méndez-Salazar EO, Vázquez-Mellado J, Zamudio-Cuevas Y, Francisco-Balderas A, Martínez-Flores K, Fernández-Torres J, Lozada-Pérez C, Guido-Gómora DL, Martínez-Gómez LE, Jiménez-Gutiérrez GE, Pineda C, Silveira LH, Sánchez-Chapul L, Sánchez-Sánchez R, Camacho-Rea MDC, **Martínez-Armenta C**, Burguete-García AI, Orbe-Orihuela C, Lagunas-Martínez A, Palacios-González B, López-Reyes A. The impact of short-chain fatty acid-producing bacteria of the gut microbiota in hyperuricemia and gout diagnosis. *Clin Rheumatol.* 2023 Jan;42(1):203-214.

Laura E. Martínez-Gómez, Brígida Herrera-López, **Carlos Martinez-Armenta**, Silvestre Ortega-Peña, Dafne L. Guido-Gómora, María Carmen Camacho-Rea, Carlos Suarez-Ahedo, Paola Vázquez-Cárdenas, Gilberto Vargas-Alarcón, Gustavo Rojas-Velasco, José-Manuel Fragoso, Rosa P Vidal-Vázquez, Juan P Ramírez-Hinojosa, Felipe de J Martínez-Ruiz, Dulce M Zayago-Angeles, Mónica Maribel Mata-Miranda, Gustavo Jesús Vázquez-Zapién, Adriana Martínez-Cuatzitl, Edith Barajas-Galicia, José Manuel Rodríguez-Pérez, Roberto Coronado-Zarco, Vania Lucas-Tenorio, Rafael Franco-Cendejas, Luis Esau López-Jácome, Rocío Carmen Vázquez-Juárez, Jonathan J Magaña, Julio Granados, Luis Ramos-Tavera, Carlos Pineda, Gabriela Angélica Martínez-Nava, and Alberto López-Reyes. Complicity of the pre-existing clinical phenotype with the outcome of death in COVID-19 patients. *Investigación en Discapacidad.* Vol.8 No.3 85-90.

Jimenez-Gutierrez GE, Martínez-Gómez LE, **Martinez-Armenta C**, Pineda C, Martínez-Nava GA, Lopez-Reyes A. Molecular Mechanisms of Inflammation in Sarcopenia: Diagnosis and Therapeutic Update. *Cells.* 2022 Aug 1;11(15):2359. doi: 10.3390/cells11152359. PMID: 35954203; PMCID: PMC9367570.

Martínez-Gómez L.E, Ibarra-González I, Fernández-Lainez C, Tusie T, Moreno-Macías H, **Martinez-Armenta C**, Jimenez-Gutierrez G.E, Vázquez-Cárdenas P, Vidal-Vázquez P, Ramírez-Hinojosa J.P, et al. Metabolic reprogramming in SARS-CoV-2

infection impacts the outcome of COVID-19 patients. *Frontiers in Immunology* 2022, 13. doi:10.3389/fimmu.2022.936106.

Martínez-Gómez LE, Herrera-López B, **Martínez-Armenta C**, Ortega-Peña S, Camacho-Rea MDC, Suarez-Ahedo C, Vázquez-Cárdenas P, Vargas-Alarcón G, Rojas-Velasco G, Fragoso JM, Vidal-Vázquez P, Ramírez-Hinojosa JP, Rodríguez-Sánchez Y, Barrón-Díaz D, Moreno ML, Martínez-Ruiz FJ, Zayago-Angeles DM, Mata-Miranda MM, Vázquez-Zapién GJ, Martínez-Cuazitl A, Barajas-Galicia E, Bustamante-Silva L, Zazueta-Arroyo D, Rodríguez-Pérez JM, Hernández-González O, Coronado-Zarco R, Lucas-Tenorio V, Franco-Cendejas R, López-Jácome LE, Vázquez-Juárez RC, Magaña JJ, Cruz-Ramos M, Granados J, Hernández-Doño S, Delgado-Saldivar D, Ramos-Tavera L, Coronado-Zarco I, Guajardo-Salinas G, Muñoz-Valle JF, Pineda C, Martínez-Nava GA, López-Reyes A. ACE and ACE2 Gene Variants Are Associated With Severe Outcomes of COVID-19 in Men. *Front Immunol.* 2022 Feb 17;13:812940. doi: 10.3389/fimmu.2022.812940. PMID: 35250987; PMCID: PMC8892378.

López-Reyes A, **Martínez-Armenta C**, Espinosa-Velázquez R, Vázquez-Cárdenas P, Cruz-Ramos M, Palacios-Gonzalez B, Gomez-Quiroz LE, Martínez-Nava GA. NLRP3 Inflammasome: The Stormy Link Between Obesity and COVID-19. *Front Immunol.* 2020 Oct 30;11:570251. doi: 10.3389/fimmu.2020.570251. PMID: 33193349; PMCID: PMC7662564



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00149

Matrícula: 2192602058

Estudio *in vitro* e *in vivo* del potencial de la miel de grado médico para su uso como viscoelástico en la articulación de rodilla.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 30 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. MAYLIN ALMONTE BECERRIL
DRA. GABRIELA ANGELICA MARTINEZ NAVA
DR. LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA



CARLOS ALEJANDRO MARTINEZ ARMENTA

ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: CARLOS ALEJANDRO MARTINEZ ARMENTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SEPARENO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. MAYLIN ALMONTE BECERRIL

VOCAL

DRA. GABRIELA ANGELICA MARTINEZ NAVA

SECRETARIO

DR. LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA