

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA QUERCETINA
NANOVEHICULIZADA EN SISTEMAS LIPOSOMALES SOBRE LAS CÉLULAS DE
HIPOCAMPO DE RATAS

VALERIA NIÑO GIRALDO

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FÁRMACEUTICA

SANTIAGO DE CALI

2018

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA QUERCETINA
NANOVEHICULIZADA EN SISTEMAS LIPOSOMALES SOBRE LAS CÉLULAS DE
HIPOCAMPO DE RATAS

VALERIA NIÑO GIRALDO

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA

TUTOR

CRISTHIAN JAVIER YARCE, MSc.

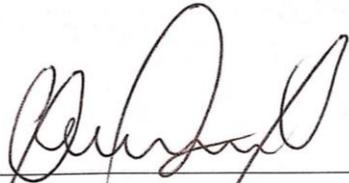
COTUTOR

ÁLVARO BARRERA OCAMPO, MSc, PhD

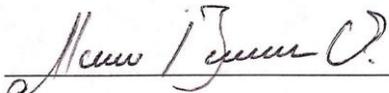
SANTIAGO DE CALI

2018

AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II



Cristhian Javier Yarce
Tutor del proyecto



Alvaro Barrera Ocampo
Co-tutor del proyecto



Juan Diego Echeverri
Evaluador del proyecto

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
2. METODOLOGÍA UTILIZADA	10
2.1 Materiales.....	10
2.2 Preparación de los sistemas liposomales.....	10
2.3 Caracterización fisicoquímica de los sistemas liposomales desarrollados.....	12
2.4 Determinación del porcentaje de encapsulación de la quercetina en los sistemas liposomales desarrollados.	12
2.5 Preparación de los cultivos celulares.....	13
2.6 Evaluación de la viabilidad celular con los sistemas liposomales desarrollados	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1 Caracterización fisicoquímica de los sistemas liposomales obtenidos por medio de las técnicas dispersión de luz dinámica	15
3.2 Determinación de la capacidad de encapsulación de quercetina por medio de los sistemas liposomales obtenidos mediante la técnica de ultrafiltración-centrifugación.	20
3.3 Evaluación de la actividad neuroprotectora de la quercetina liposomal en cultivos de neuronas hipocampales de rata.....	22
4. CONCLUSIONES	29
5. AGRADECIMIENTOS	31
6. REFERENCIAS	32
7. ANEXOS	36
7.1 MARCO TEÓRICO.....	36
7.1.1 Enfermedad del alzheimer.....	36
7.1.2 Quercetina como antioxidante para el tratamiento del Alzheimer	37
7.1.3 Liposomas	38
7.1.4 Espectrofotometría UV-Vis.....	40
7.1.5 Caracterización fisicoquímica de los liposomas.....	40
7.1.6 Ensayos in vitro en cultivos primarios de células de hipocampo de ratas.....	44
7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA	45
7.3 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA	46
7.4 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN	47
7.5 ENSAYOS DE VIABILIDAD.....	49
7.5.1 Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad	49

7.5.2	Composición de los medios utilizados en el cultivo	56
7.6	APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN	57

RESUMEN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que compromete gran parte de las neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo, lo que causa pérdidas en las capacidades cognitivas de las personas que la presentan y por ende una disminución en su calidad de vida. Hoy en día, no se han encontrado medicamentos que actúen como tal en la muerte neuronal. Para solventar esto, se ha planteado el uso de la quercetina, una molécula antioxidante, que provee un efecto positivo frente al estrés oxidativo de las neuronas. Sin embargo, este compuesto presenta problemas de solubilidad y por tanto de biodisponibilidad, por lo que es necesario el uso de estrategias que permitan abordar esta problemática.

Para lo anterior, en este proyecto se desarrolló la nanovehiculización de la quercetina por medio de sistemas liposomales mediante la técnica de inyección de etanol y se caracterizaron fisicoquímicamente las nanoestructuras formadas. Además, se realizaron ensayos biológicos para observar el efecto antioxidante del medicamento nanovehiculizado en neuronas hipocampales de ratas.

Se encontró que los potenciales zeta fueron negativos (entre -10 y -20 mV) y los tamaños de los sistemas liposomales estuvieron en la escala nanométrica (entre 100 y 500 nm) los primeros 4 días, siendo físicamente inestables días después. Por otra parte, los porcentajes de encapsulación fueron de 100% para las concentraciones de quercetina de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, en cuanto a la viabilidad celular, se encontró que la concentración óptima para la neuroprotección es de 5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ genera toxicidad.

Palabras claves: Alzheimer, quercetina nanovehiculizada, liposomas, inyección de etanol, neuroprotección.

ABSTRACT

Alzheimer's is a neurodegenerative disease that involves a large part of the neurons of the cerebral cortex and the hippocampus, which causes losses in the cognitive abilities of the people who present it and therefore a decrease in their life's quality. Nowadays, no drugs have been found that act in neuronal death. To solve this, the use of quercetin, an antioxidant molecule which provides a positive effect against the oxidative stress of neurons, has been proposed. However, this compound has problems of solubility and therefore of bioavailability, so it is necessary to use strategies to address this problem.

For this, in this project was developed the nanovehicularization of quercetin through liposomal systems by means of the ethanol injection technique and the nanostructures formed were physicochemically characterized. In addition, biological tests were conducted to observe the antioxidant effect of the nanovehicularized drug in hippocampal neurons of rats.

It was found that the zeta potentials were negative (between -10 and -20 mV) and the sizes of the liposomal systems were in the nanoscale (between 100 and 500 nm) the first 4 days, being physically unstable days later. On the other hand, the encapsulation percentages were 100% for quercetin concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$. Finally, in terms of cell viability, it was found that the optimal concentration for neuroprotection is 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, while the concentration of 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ generates toxicity.

Key words: Alzheimer, nanovehicularized quercetin, liposomes, ethanol injection, neuroprotection.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta la actualidad no existe ningún tratamiento que detenga el avance en la pérdida progresiva de las neuronas, es decir, la neurodegeneración, en enfermedades como el Alzheimer. La enfermedad del Alzheimer (EA), es un trastorno progresivo e incesante que afecta amplias áreas de la corteza cerebral e hipocampo (Masters et al., 2015). Esta es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente en personas adultas, caracterizada por un deterioro en la cognición y la memoria (Barrera & Lopera, 2016). Es importante destacar que, aunque la EA no es mortal, una vez diagnosticada, la enfermedad prevalece durante el resto de vida del paciente y, en todos los casos, la comorbilidad es mayor. (Martínez, 2009)

Hoy en día, tan sólo existen diversos fármacos que de una forma u otra alivian parcialmente los síntomas que sufren los pacientes de EA, sin detener realmente el proceso neuronal (Alzheimer Association, 2016). De allí se genera un gran interés por mitigar dicha patología y estudiar a fondo los posibles compuestos que tengan una acción directa sobre la muerte neuronal.

Teniendo en cuenta que la EA se puede generar debido al estrés oxidativo generado en las neuronas, existen compuestos que tienen una actividad antioxidante lo que podría potencialmente generar un efecto neuroprotector. Entre estos compuestos se encuentra la quercetina, un flavonoide que ejerce de manera confiable dicho efecto al aumentar la resistencia de las neuronas al estrés oxidativo, dado que tiene una alta actividad de eliminación de radicales de oxígeno, además de la capacidad de inhibir la xantina oxidasa y la peroxidación de lípidos (Fiorani et al., 2010). Dada la importancia de encontrar nuevos compuestos que sirvan como posibles terapias farmacéuticas para las enfermedades neurodegenerativas, en el 2016, Lucio G. Costa et al estudiaron los mecanismos relacionados con la capacidad de la quercetina para contrarrestar la neurotoxicidad mediada por el estrés oxidativo y algunos mecanismos potenciales adicionales para la neuroprotección (Costa, Garrick, Roquè, & Pellacani, 2016), afirmando así, su potencial utilidad para la EA. Sin embargo, esta molécula presenta desventajas en términos de su solubilidad en agua puesto que es apolar, lo cual afecta su absorción y por ende su biodisponibilidad. Por ello, se requiere

de estructuras que permitan potenciar la solubilidad de la misma para que así pueda cumplir su efecto terapéutico.

Las estructuras utilizadas en este proyecto corresponden a nanosistemas tales como los liposomas. Estos hacen referencia a pequeñas vesículas de forma esférica que se pueden generar a partir del colesterol y los fosfolípidos naturales no tóxicos, además de que, debido a su tamaño y carácter hidrofílico e hidrofóbico (además de la biocompatibilidad), son sistemas prometedores para la administración de fármacos. Las propiedades de estas nanoestructuras difieren considerablemente con la composición de los lípidos, la carga superficial, el tamaño y el método de preparación (Fiorani et al., 2010). En el año 2017, Claudia Bonechi et al. desarrollaron un estudio sobre el efecto protector que posee la quercetina en solución vs encapsulada para observar su efecto frente al estrés oxidativo. Los resultados biológicos de este, confirmaron que el uso de liposomas como vehículos pueden ayudar a la internalización celular de este flavonoide (Bonechi et al., 2018). Además, los resultados demostraron que dichos sistemas son excelentes para la administración de fármacos.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es claro que es de gran importancia, abarcar a fondo el efecto de la quercetina frente al estrés oxidativo de las neuronas y las estrategias que permiten mejorar sus propiedades de solubilidad. Por lo tanto, este proyecto buscó proveer información sobre la actividad antioxidante de la quercetina vehiculizada en un nanosistema liposomal y su potencial aplicación como tratamiento paliativo de la EA.

Para proveer dicha información, el proyecto tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antioxidante de la quercetina vehiculizada en liposomas sobre células de hipocampo de ratas. Esto se logró, inicialmente, preparando sistemas liposomales por medio de la metodología de inyección de etanol asistida por ultrasonido. Además, se caracterizaron fisicoquímicamente dichos sistemas mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica, se determinó la capacidad de encapsulación de la quercetina por los liposomas obtenidos mediante la técnica de ultrafiltración-centrifugación y, finalmente, se realizó un ensayo de viabilidad celular con el cual se evaluó la actividad neuroprotectora de la quercetina liposomal en cultivos de neuronas hipocampales de rata.

2. METODOLOGÍA UTILIZADA

2.1 Materiales

En este proyecto se utilizó la quercetina como componente activo a encapsular, la cual fue obtenida de Sigma-Aldrich y se usó como se recibió. Además, se utilizó como fase acuosa un buffer fosfato a pH 7,4; y como fase orgánica colesterol, epikuron 200, epikuron 145 y etanol absoluto. El agua utilizada fue tipo 1 o ultrapura, obtenida por medio del sistema de purificación Elix Essential Millipore®, que se encuentra en las instalaciones de la Universidad Icesi.

2.2 Preparación de los sistemas liposomales

De acuerdo con otros estudios, las concentraciones de quercetina con actividad neuroprotectora varían entre 5 µg/mL, 10 µg/mL y 20 µg/mL (Ansari, Abdul, Joshi, Opii, & Butterfield, 2009). Para ello, se consideró el hecho de que en la metodología hay una serie de diluciones en las que se comienza con un 100% de la fase orgánica y luego esta disminuye a un 5%. Por tanto, para obtener finalmente la concentración, por ejemplo, de 5 µg/mL, se debió comenzar con 100 µg/mL. Además, dado que los liposomas han presentado porcentajes de encapsulación alrededor del 65%, en realidad debe iniciarse con una concentración de 153.8 µg/mL. Lo anterior se realizó en las 3 concentraciones, por lo que se requirió una concentración inicial de 308 µg/mL en el caso de 10 µg/mL y una de 615.4 µg/mL para 20 µg/mL.

Inicialmente, se preparó una solución madre de quercetina con la mayor concentración propuesta anteriormente, es decir, 615.4 µg/mL. Con dicha solución se realizaron las diferentes diluciones para obtener las demás concentraciones. Teniendo en cuenta las diluciones a realizar en el método de preparación de liposomas, la tabla 1 indica las cantidades del principio activo y de etanol absoluto utilizadas en el proceso, con el objetivo de garantizar una adecuada encapsulación.

Tabla 1. Volumen requerido de la solución de quercetina y etanol al 96%

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen requerido (μL)	Volumen de solución de quercetina (μL)	Volumen de etanol absoluto (μL)
5	28,5	7,12	21,38
10	28,5	14,3	14,2
20	28,5	28,5	0

Para el desarrollo de los sistemas liposomales, se prepararon 100 μL de la fase oleosa la cual contiene 30 μL de colesterol, 30 μL de epikuron 200, 11.5 μL de epikuron 145, quercetina y etanol. Las cantidades de quercetina y etanol se adicionan dependiendo de la concentración necesaria (tabla 1). Dicha fase oleosa se inyectó sobre la fase acuosa, se agitó en vortex y se dejó en reposo durante 10 minutos. Luego, se inyectaron lentamente 100 μL de la mezcla obtenida en 900 μL de buffer fosfato 7.4 y se llevó a tubos eppendorf de ultrafiltración para su posterior centrifugación durante 6 minutos a 10000 rpm. Se recolectó la cantidad de muestra retenida y se llevó a 1 mL con buffer ACSF para la caracterización fisicoquímica, la realización de los ensayos biológicos y la medición de la cantidad de quercetina encapsulada en los sistemas liposomales. Por otra parte, el material filtrado también fue recolectado y llevado a 1 mL con buffer ACSF para la determinación del porcentaje de encapsulación en el lector de placas.

Según lo mencionado anteriormente, en la Figura 1 se presenta un resumen del procedimiento llevado a cabo en la preparación de los sistemas liposomales. La metodología seguida corresponde a la planteada en el trabajo “Modificación superficial de liposomas mediante un polímero catiónico bioadherente para la vehiculización de ampicilina” (Árevalo, 2016).

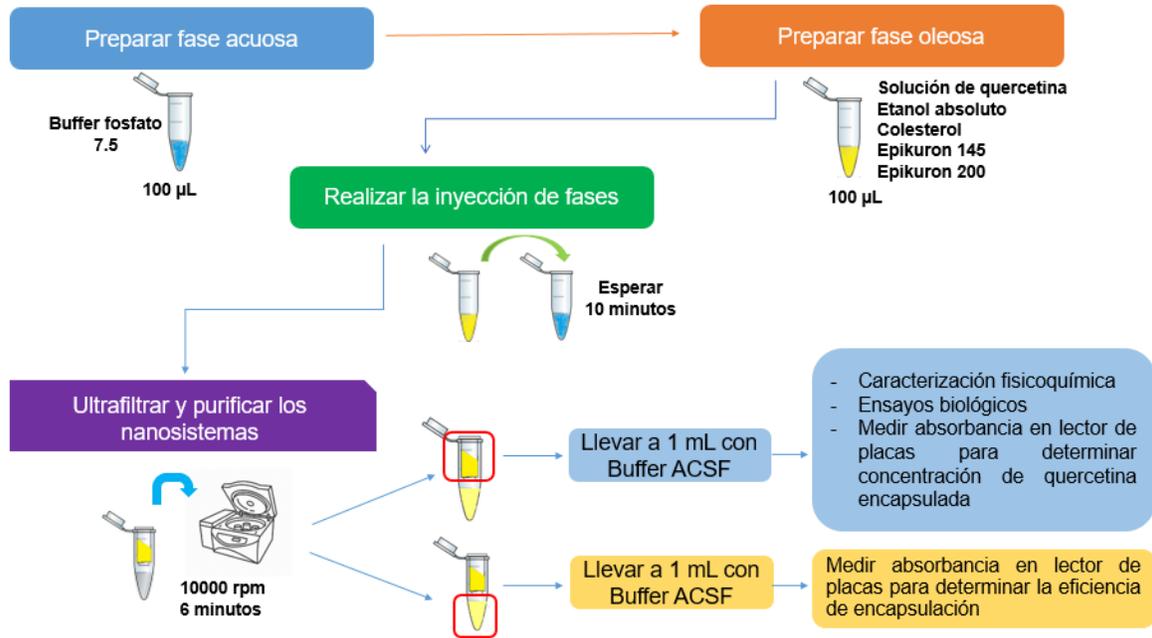


Figura 1. Proceso para la preparación de liposomas

Nota: Dado a que se va a trabajar con cultivos celulares, los liposomas destinados a ensayos biológicos se prepararon en un laboratorio estéril que contiene cabina de flujo laminar.

2.3 Caracterización fisicoquímica de los sistemas liposomales desarrollados.

Para la caracterización fisicoquímica de los sistemas liposomales desarrollados se determinaron el potencial Zy y el tamaño de partícula. Para ello, no hubo necesidad de realizar dilución de las muestras, por lo que se hizo la medición directamente. Dichas mediciones se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments), presente en el laboratorio del grupo de investigación en diseño y formulación de productos de la universidad ICESI.

2.4 Determinación del porcentaje de encapsulación de la quercetina en los sistemas liposomales desarrollados.

Inicialmente se realizó una curva de calibración con el fin de obtener una ecuación de la recta. Para ello, se realizaron 5 muestras que quercetina en metanol:buffer fosfato pH 7.4 (50:50) a concentraciones de 1.5, 3, 6, 12 y 24 µg/mL. Cabe destacar que se realizó una solución

madre de la concentración más alta (24 $\mu\text{g/mL}$) y luego se realizaron las diluciones respectivas. Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras en el lector de microplacas a una longitud de onda de 255, puesto que a esta se detecta la quercetina. La ecuación de la recta obtenida fue $\text{Abs} = 0.0272 [\text{Concentración}] - 0.0154$ con un R^2 de 1 (Ver anexo 7.2).

Luego de conocer la ecuación de la recta, para la determinación del porcentaje de quercetina encapsulado, se realizó el procedimiento descrito en el ítem 2.4.2. Posterior a la ultrafiltración, se midió la absorbancia del material retenido y del material filtrado. La primera con el objetivo de conocer la concentración de quercetina encapsulada en los liposomas y la absorbancia del material filtrado permitió calcular en porcentaje de encapsulación de la quercetina. Por último, haciendo uso de la ecuación de la recta, se calcularon las concentraciones de todas las muestras y con el uso de la siguiente ecuación se calculó el porcentaje de la eficiencia de encapsulación:

$$\begin{aligned} & \% \text{ Eficiencia de encapsulación} \\ & = \frac{\text{Concentración teórica} - \text{concentración del material filtrado}}{\text{concentración teórica}} \times 100 \quad (1) \end{aligned}$$

Para los ítems 2.1.4 y 2.1.5, se siguió la metodología descrita en el proyecto de grado “Nanoencapsulación de quercetina para optimizar su aplicación en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer” (Echeverri, n.d.).

2.5 Preparación de los cultivos celulares

Dado que los cultivos corresponden a cultivos primarios de las neuronas provenientes del hipocampo, se sacrificaron ratas en día postnatal P0 a P2. Luego de esto, se extrajo el cerebro y se puso en medio de disección de frío para prevenir la muerte neuronal. Posteriormente, se utilizó DNAsa 0,1 mg/mL y Tripsina 0.25% para separar las neuronas del tejido y evitar la agregación entre ellas.

Por último, se cultivaron las neuronas en platos especializados con poli-L-lisina 1mg/mL (promueve la adhesión celular) y con medio mínimo esencial (MEM) como medio de cultivo. En el anexo 7.5.2 se observan todos los componentes utilizados en el medio de cultivo y el medio de disección.

El MEM fue reemplazado a las 4 horas con medio neurobasal suplementado con B27, lo que permitió el desarrollo y la maduración neuronal. Este medio fue renovado tres veces en la semana.

2.6 Evaluación de la viabilidad celular con los sistemas liposomales desarrollados

Inicialmente, se adicionaron las diferentes concentraciones del fármaco nanovehiculizado en el sistema liposomal, además de soluciones de quercetina a las mismas concentraciones ya establecidas, pero sin la formación de los liposomas; y se incubaron las células durante un tiempo determinado experimentalmente. Posteriormente, se indujo estrés oxidativo a las neuronas utilizando L-glutamato y se incubaron durante 1 a 6 horas. Ambas incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂

Luego de que se incubaron las células durante un tiempo adecuado, se adicionó MTT 0,5mg/mL y se incubaron las células 37°C y 5% de CO₂. El MTT es un tetrazol de color amarillo que, al convertirse en formazán (anexo 7.5.3), cambia a una coloración morada. Dicho cambio de coloración representa viabilidad celular dado que la formación de formazán es catalizada por enzimas mitocondriales.

Finalmente, luego de la incubación se adicionó dimetilsulfoxido y se midió la absorbancia a 570 nm para la determinación de la viabilidad celular.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica de los sistemas liposomales obtenidos por medio de las técnicas dispersión de luz dinámica

Con el objetivo de caracterizar fisicoquímicamente los sistemas liposomales y, además, conocer la estabilidad de estos a medida que pasa el tiempo, se realizó un estudio en el cual se midieron el tamaño de partícula o diámetro hidrodinámico y el potencial Zeta de los liposomas durante 6 días. En la figura 2 se observan los resultados obtenidos de potencial Zeta para los liposomas desarrollados en las concentraciones establecidas y los liposomas control los cuales no contienen la molécula de interés.

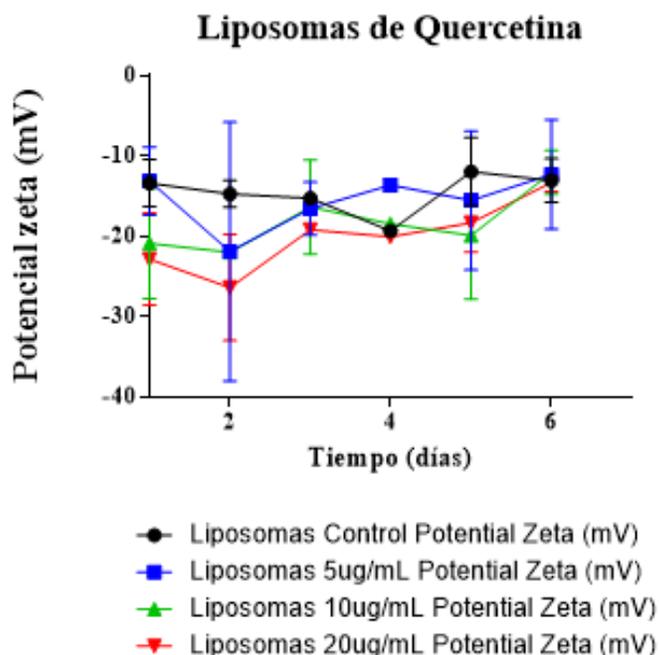


Figura 2. Potencial Z de los liposomas de quercetina en función del tiempo

Inicialmente, es importante aclarar el hecho de que, en todas las mediciones realizadas a lo largo del tiempo, las cargas del potencial zeta dieron en el rango negativo. Se cree que la carga negativa mostrada por los liposomas es el resultado del Epikuron 200 y el Epikuron 145 utilizados para la formación de los sistemas liposomales. El epikruon 200 contiene un

95% de fosfatidilcolina (figura 3A), que no tiene carga neta, mientras que otros componentes (5%) como el ácido fosfatídico (figura 3B) y fosfatidilinositol (figura 3C) están cargados negativamente (Huang et al., 2011). Además, el epikuron 145 tiene una composición muy similar a la mencionada anteriormente. Esto permite que los liposomas tengan carga negativa, lo cual se vea reflejado en la medición del potencial zeta.

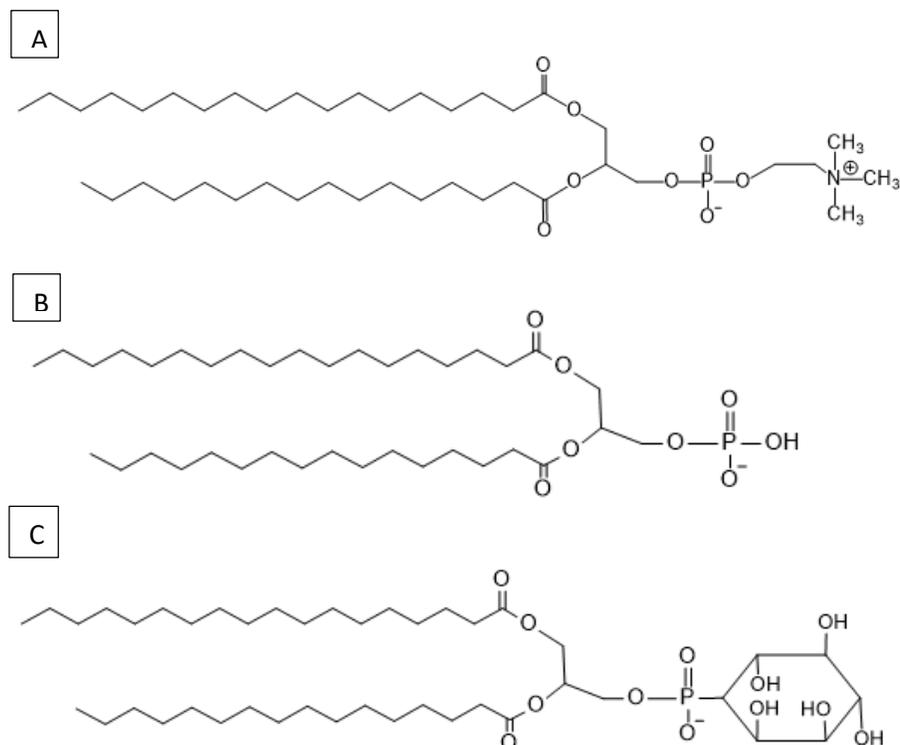


Figura 3. Estructura química A) fosfatidilcolina B) ácido fosfatídico y C) fosfatidilinositol

Por otra parte, se puede observar que, en general, los potenciales zeta de los liposomas que contienen quercetina tienen un valor más negativo que los obtenidos para los liposomas control. Esto puede deberse, en parte, al efecto electrocinético que aporta la quercetina, dado que hay una fracción de esta que se encuentra por fuera del liposoma (figura 4).

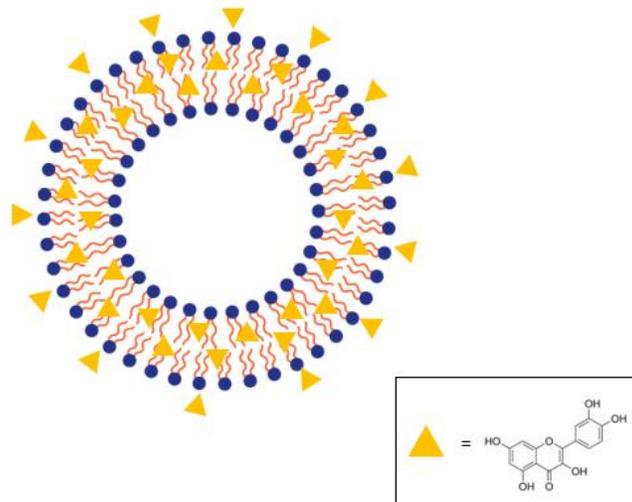


Figura 4. Representación gráfica de los liposomas con quercetina.

Dicho efecto electrocinético se debe a la alta densidad electrónica de la molécula, la cual es generada por la cantidad de oxígenos presentes en ella (figura 5). Lo anterior permite que la quercetina ayude a que se cree una mayor carga negativa y que, finalmente, la magnitud de los potenciales negativos sea mucho mayor. Además, el pKa del OH más ácido de la quercetina es de 7.03 (Lemańska et al., 2004), es decir que, debido a que los liposomas están preparados en un medio a pH 7.4, este oxígeno de la molécula se va a encontrar ionizado, lo que aporta a que haya una mayor carga negativa como tal de los liposomas.

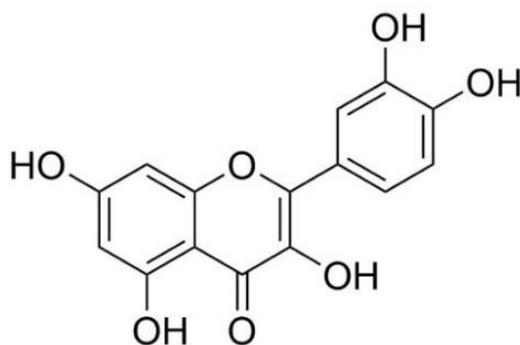


Figura 5. Estructura química de la quercetina (Correa & Longart, 2010)

Para la segunda parte de la caracterización, se determinó el tamaño de partícula o diámetro hidrodinámico de estos. A continuación, se encuentra la gráfica de los resultados obtenidos:

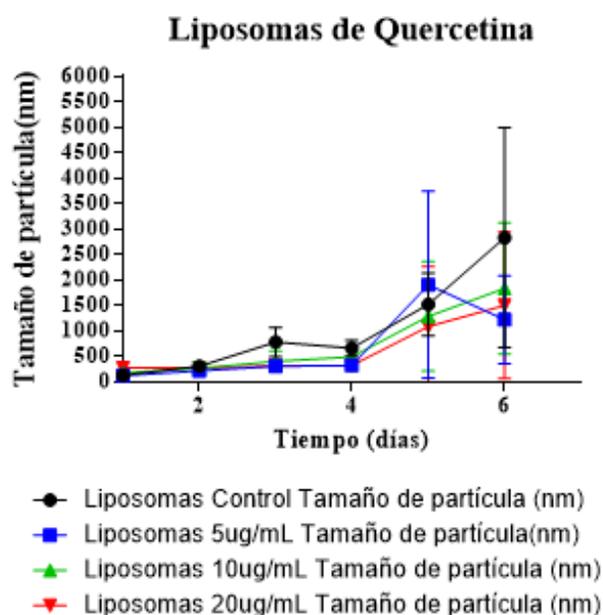


Figura 6. Tamaño de partícula de los liposomas de quercetina en función del tiempo

En la figura 6 se puede notar que, aunque en los primeros dos días los tamaños de los 4 sistemas liposomales se mantienen similares, los próximos días el tamaño de los liposomas control comienza a ser mayor que el de los liposomas que contienen la quercetina. Se tiene la hipótesis teniendo en cuenta la forma del liposoma dependiendo de lo que haya en su interior. Cuando se tienen liposomas en los cuales no se ha encapsulado ningún principio activo, como en el caso de los liposomas control, en el interior de estos se incluyen moléculas de agua y, en ocasiones, pueden ser muchas de estas moléculas. Lo anterior permite que el sistema liposomal sea mucho más flexible, por lo que puede generarse una forma que no sea esférica (figura 7B) y, por ende, el diámetro hidrodinámico sea mayor. Por el contrario, dado que la quercetina tiene una zona de ubicación específica en la parte apolar de la bicapa, hay una alta cantidad de fosfolípidos tratando de estabilizar la molécula, lo que permite que se presente un mayor grado de ordenamiento de las cadenas apolares y por tanto la estructura, al ser más rígida, sea más esférica y compacta (figura 7A), generando un tamaño de partícula menor.

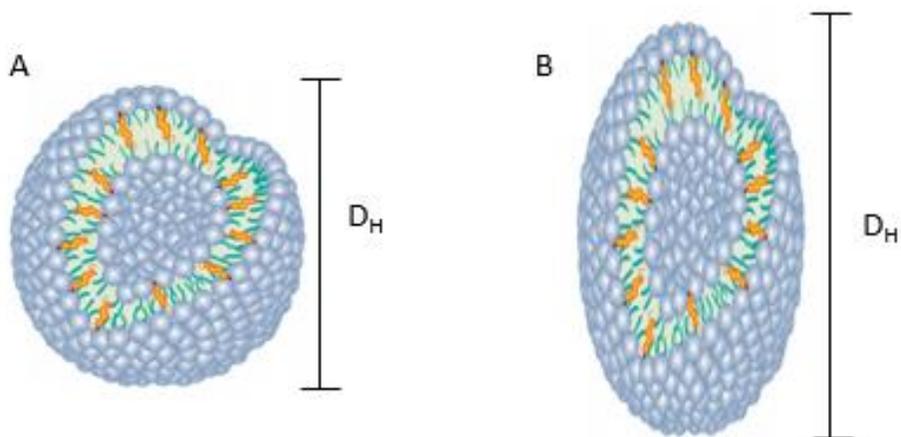


Figura 7. A) Diámetro hidrodinámico del liposoma en su forma esférica (Monteiro, Martins, Reis, & Neves, 2014). B) Diámetro hidrodinámico del liposoma en su forma no esférica

En cuanto al estudio de estabilidad como tal, se obtuvo que a medida que pasan los días los liposomas se vuelven más inestables. Esto se ve reflejado en ambas características fisicoquímicas evaluadas en el proyecto, dado que el potencial zeta se vuelve cada vez menos negativo con el paso de los días y el tamaño es cada vez mayor, llegando a valores incluso por encima de los 1000 nm.

Para explicar lo mencionado anteriormente, es necesario primero considerar la estabilidad química de algunos fosfolípidos que componen la bicapa lipídica de los sistemas liposomales. Se han descrito dos vías de degradación, para los fosfolípidos en dispersiones de liposomas (acuosas), que podrían limitar la vida útil de las dispersiones de liposomas. Estas son las vías de degradación oxidativa e hidrolítica. La oxidación de los fosfolípidos, particularmente aquellos con cadenas que contienen grupos acilo (RCO) insaturados, han recibido una atención considerable a lo largo de los años. Las cadenas con grupos acilo de las moléculas de fosfolípidos se oxidan a través de un mecanismo de cadena de radicales libres en ausencia de oxidantes específicos. Si hay oxígeno presente, el proceso se desarrolla más y, a través de la formación de hidroperóxidos, puede producirse la fisión de la cadena de ácidos grasos, generando la destrucción del liposoma. Por otro lado, los enlaces éster presentes en las moléculas de fosfolípido son susceptibles a hidrólisis, lo que causa también que el liposoma se vea afectado (Grit & Crommelin, 1993).

Todo lo anterior conlleva a que los sistemas liposomales sean muy inestables y, por tanto, sea de gran complejidad el uso de este tipo de nanosistemas. Para disminuir el riesgo a la oxidación de los fosfolípidos, la muestra se debe proteger frente a la luz y el oxígeno (Grit & Crommelin, 1993).

Adicionalmente, los procesos físicos como la agregación/floculación y la fusión/coalescencia que afectan la vida útil de los liposomas pueden provocar la pérdida del fármaco asociado al liposoma y cambios en el tamaño. La agregación es la formación de unidades más grandes de material liposomal; estas unidades todavía están compuestas de liposomas individuales. En principio, este proceso es reversible, por ejemplo, aplicando fuerzas de corte suaves o cambiando la temperatura. Sin embargo, la presencia de agregación puede acelerar el proceso de coalescencia de los liposomas, lo que indica que se forman nuevas estructuras coloidales. Como la coalescencia es un proceso irreversible, los liposomas originales no pueden ser recuperados (Yadav, Murthy, Shete, & Sakhare, 2011).

Además, se debe tener en cuenta que la dispersión coloidal es a menudo termodinámicamente inestable. Dado que los procesos espontáneos ocurren en la dirección de la disminución de la energía libre de Gibbs y que, la separación de un sistema disperso de dos fases para formar dos capas distintas es un cambio en la dirección de la disminución de la energía libre de Gibbs, y, la separación de fases es termodinámicamente estable (Yadav et al., 2011). Es por esto que, con el paso de los días, se puede observar una mayor inestabilidad de los sistemas liposomales, reflejado en sus características fisicoquímicas. Para mejorar este tipo de inestabilidad, se podría adicionar algún tensoactivo que permita disminuir la tensión interfacial y mantener la dispersión liposomal estable por una mayor cantidad de días.

3.2 Determinación de la capacidad de encapsulación de quercetina por medio de los sistemas liposomales obtenidos mediante la técnica de ultrafiltración-centrifugación.

Como se observa en la figura 8, los resultados de la eficiencia de encapsulación de la quercetina en los sistemas liposomales dieron bastante buenos para las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo un porcentaje de encapsulación del fármaco en un 100%. Como se reporta en la literatura, los factores que afectan la eficacia de la encapsulación del fármaco

dentro de los liposomas varían y se basan principalmente en la composición de los liposomas (es decir, fosfolípidos y colesterol) y en las propiedades del fármaco encapsulado.

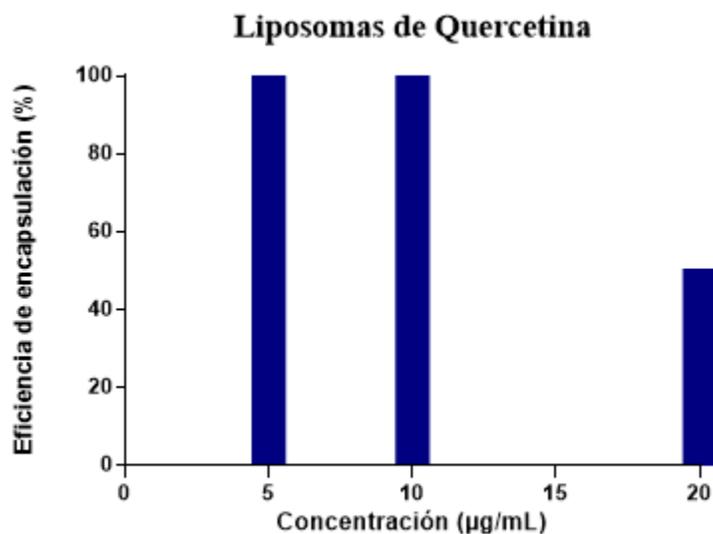


Figura 8. Eficiencia de encapsulación de la quercetina en los liposomas

Con respecto a los fármacos encapsulados, la eficacia de encapsulación suele verse afectada por el carácter del fármaco hidrófilo/lipófilo. Las eficiencias de encapsulación de fármacos insolubles en agua suelen ser altas, alcanzando valores de hasta el 100%. Sin embargo, las eficiencias de encapsulación de fármacos solubles en agua están limitadas por el volumen del núcleo acuoso de los liposomas, ya que en su mayoría están atrapadas en las cavidades acuosas (Jaafar-Maalej, Diab, Andrieu, Elaissari, & Fessi, 2010). Lo anterior quiere decir que, si la zona hidrofóbica del liposoma es mayor que la hidrofílica, se va a favorecer la encapsulación de los fármacos apolares.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la composición de los liposomas también es un factor importante que determina la eficiencia de encapsulación. Según estudio realizados, el hecho de tener una mayor concentración de fosfolípidos, para la formación de la bicapa lipídica, genera una mayor encapsulación de los fármacos apolares. Lo anterior se debe a que hay una asociación más alta del fármaco con las bicapas de fosfolípidos de liposomas cuando hay un aumento de la superficie de lípidos y el número de bicapas, puesto que se ha informado

que el grosor de la superficie lipídica del liposoma aumenta con la cantidad creciente de fosfolípido utilizado en la formulación (Jaafar-Maalej et al., 2010). En este proyecto se utilizaron concentraciones máximas de Epikuron 145 y Epikuron 200, lo que explica los porcentajes de encapsulación obtenidos.

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia de encapsulación de 100% se presentó en los liposomas con quercetina a 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Para la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, no tenía sentido hacer uso de la ecuación (1), ya que la concentración hallada en los liposomas fue muy variada y nunca mayor a 10 $\mu\text{g/mL}$, es por esto que se registra un porcentaje de encapsulación menor al 50%. Teniendo en cuenta esto, se plantea que a concentraciones altas la quercetina se oxida y genera una nueva estructura la cual ya no se detecta en la longitud de onda utilizada en el lector de microplacas.

3.3 Evaluación de la actividad neuroprotectora de la quercetina liposomal en cultivos de neuronas hipocampales de rata

En este proyecto se realizaron 2 ensayos de viabilidad, evaluando la actividad neuroprotectora de la quercetina nanovehiculizada. Para ello, se cultivaron las células del hipocampo de ratas y se adicionaron diferentes compuestos para conocer el efecto de estos sobre la viabilidad celular. Inicialmente, se tuvo medio neurobasal como control negativo de la muerte neuronal, puesto que este es el medio normal utilizado para el mantenimiento y crecimiento de las neuronas en los cultivos celulares. Por otro lado, el Triton X-100 es un detergente que fue adicionado para generar la ruptura de la membrana celular, lo que provoca muerte por necrosis celular y tener así un control positivo frente a dicha muerte. Adicionalmente, se adicionó buffer ACSF, un líquido cefalorraquídeo artificial que permite el entorno vital para el tejido neuronal ya que mantiene la homeostasis y osmolaridad, por lo que se espera una alta viabilidad con el uso de este. Por último, el glutamato se utilizó para inducir estrés oxidativo en las neuronas, luego de haber adicionado la quercetina y poder conocer así el efecto protector de esta. Los resultados obtenidos del primer ensayo se muestran a continuación:

Ensayo de viabilidad celular con MTT

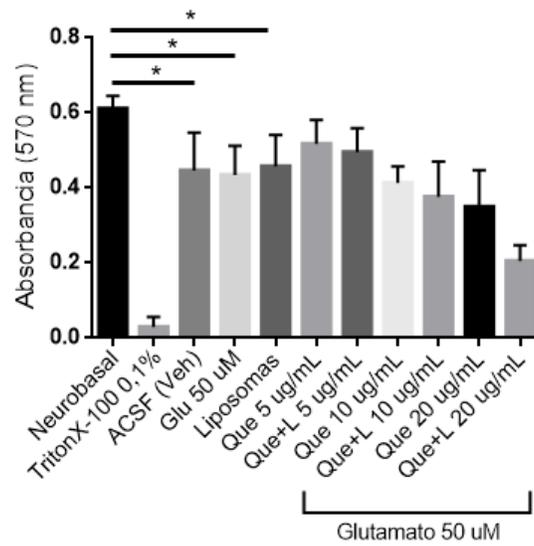


Figura 9. Primer estudio de viabilidad neuronal luego de adición de los sistemas liposomales de quercetina a diferentes concentraciones.

De acuerdo al ANOVA obtenido en este estudio y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, se observaron varias comparaciones estadísticamente significativas en este primer ensayo: Neurobasal vs. Glu 50 uM (valor $p=0.0073$), Neurobasal vs. ACSF (valor $p=0.0271$), Neurobasal vs. Liposomas (valor $p=0.0329$) y Glu 50uM vs. Que+L 20 $\mu\text{g/mL}$.

Inicialmente, se obtuvo que hay una diferencia significativa entre las neuronas en medio neurobasal y luego de la adición de glutamato a 50uM. Como se puede observar en la figura 9, la viabilidad fue menor con el uso de glutamato, lo cual corresponde con lo esperado ya que el glutamato induce estrés oxidativo lo que provoca muerte neuronal. Sin embargo, se esperaba que la viabilidad, con el uso de del glutamato, fuera un poco menor para obtener diferencias más significativas entre este y el uso de la quercetina nanovehiculizada.

Adicionalmente, se encontró que la viabilidad con el vehículo utilizado (Buffer ACSF) es mucho menor. Una posible hipótesis para este comportamiento es la falta de glucosa en la composición del buffer, ya que las neuronas necesitan de esta para obtener energía y así desarrollarse bien. Por tanto, es necesaria la adición de este carbohidrato pues se sabe que, a

nivel fisiológico, generalmente se dispone de glucosa, siendo esta el sustrato obligatorio para el cerebro.

Por otro lado, se obtuvo una comparación significativa estadísticamente entre la absorbancia en las células del control negativo y la absorbancia en las neuronas vivas luego de aplicar sistemas liposomales que no contenían quercetina. La absorbancia en las últimas fue menor, lo que quiere decir que la composición como tal de los liposomas disminuyó la viabilidad celular.

Como ya ha sido mencionado en el proyecto, los liposomas fueron preparados con epikuron 200, epikuron 145 y colesterol; y estos se encuentran en un medio acuoso a pH 7.4. Por una parte, el epikuron 200 contiene fosfatidilcolina en un alto porcentaje (95% aproximadamente), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, además de otros tipos de ácido graso (palmítico y esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico)(Huang et al., 2011). A diferencia del epikuron 200, el epikuron 145 contiene fosfatidilcolina al 50% aproximadamente (Bureau, 2013), sin embargo, el resto de la composición es muy similar. Para poder analizar un posible daño en las membranas neuronales a causa de alguno de estos componentes, se debe considerar la composición de las membranas en este tipo de células. R.O Calderón et al, en el año 1995 describieron la composición lipídica de neuronas de la raíz de ganglio dorsal de ratas (DRG). A continuación, en la tabla 2 se muestra la composición lipídica de dichas neuronas.

Tabla 2. Composición lipídica de células DRG. NS: Soma neuronal y NP: procesos neuríticos (Ang, 1988).

	% total de lípidos	
	Cuerpos (NS)	Neuritas (NP)
Fosfolípidos totales	57,06 ± 1,7	56,42 ± 1,6
Fosfolípidos neutros	48,19 ± 3,83	44,15 ± 6,39
Esfingomielina	2,77 ± 0,07	4,47 ± 0,43
Fosfatidilcolina	28,88 ± 1,44	27,00 ± 2,65
Fosfatidiletanolamina	16,54 ± 2,44	22,27 ± 4,06
Ácido total	8,87 ± 3,23	12,57 ± 1,42
Fosfatidilinositol	5,79 ± 1,40	6,34 ± 1,70
Fosfatidilserina	3,08 ± 0,31	6,23 ± 0,15
Galactolípidos totales	4,80 ± 0,27	7,71 ± 1,13
Cerebrósidos	3,13 ± 0,28	5,15 ± 0,24
Sulfatida	1,56 ± 0,12	2,56 ± 0,30
Colesterol	15,42 ± 1,05	22,14 ± 2,06
Ésteres de colesterol	4,31 ± 2,01	7,30 ± 1,03
Triacilgliceroles	2,30 ± 3,09	0,20 ± 0,02
Ácidos grasos	4,30 ± 0,51	1,01 ± 0,23
No identificado	11,81 ± 1,03	4,30 ± 0,81

Como se reporta en la tabla anterior, la composición de las membranas neuronales es similar a la composición con la que se desarrollan los liposomas, ya que el fosfolípido que las compone mayormente es la fosfatidilcolina, además de que tienen un alto porcentaje de fosfatidiletanolamina y colesterol. Por ello, que se espera que en realidad no se presente ningún tipo de toxicidad por parte de los liposomas control. Adicionalmente, dado que los liposomas son desarrollados mediante la metodología de inyección de etanol, la concentración de etanol final obtenida es mínima, por lo que no se espera tampoco que haya una toxicidad significativa. Teniendo en cuenta esto, se puede inferir que la poca viabilidad obtenida puede ser o por lo discutido anteriormente del buffer ACSF (la muestra obtenida de

liposomas se completó a 1mL con el buffer) o por algún tipo de contaminación al momento de la preparación de los liposomas control.

Adicional a lo anterior, se obtuvo otra diferencia significativa de gran importancia en este estudio (Glu 50 uM vs. Que+L 20 µg/mL), la cual será explicada más adelante con los resultados obtenidos en el segundo ensayo.

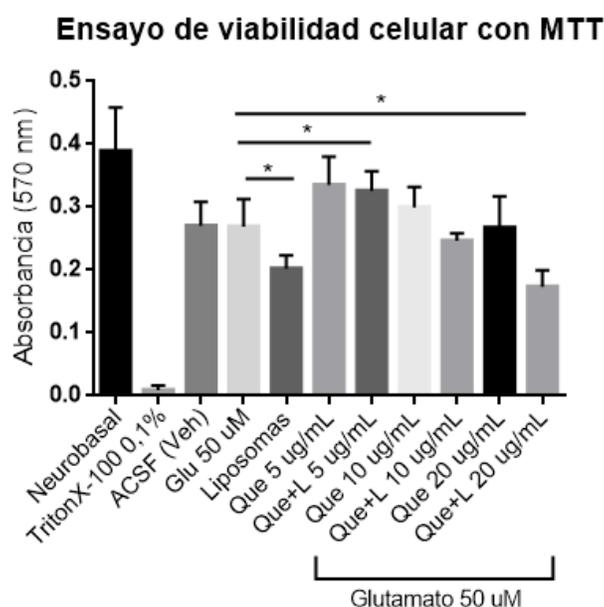


Figura 10. Segundo estudio de viabilidad neuronal luego de adición de los sistemas liposomales de quercetina a diferentes concentraciones.

En este caso, se realizó una comparación de Dunnett para conocer, específicamente, las diferencias significativas entre el glutamato y las demás muestras. De acuerdo a esto, se obtuvieron 3 comparaciones estadísticamente significativas: Glu 50uM vs. Liposomas (valor $p= 0.0448$), Glu 50uM vs. Que+L 5 µg/mL (valor $p= 0.0233$) y Glu 50 uM vs. Que+L 20 µg/mL (valor $p=0.0003$).

En primera instancia, se encontró que, a diferencia del primer ensayo, hubo una menor viabilidad con los liposomas control en comparación con el glutamato. Teniendo en cuenta además de lo explicado anteriormente, que, esta vez la viabilidad fue menor que con el vehículo (buffer ACSF) y que, los liposomas fueron preparados exactamente igual, se puede

inferir que probablemente pudo haberse presentado algún tipo de contaminación al momento de preparar los liposomas control, lo que llevó a la muerte neuronal.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos se presentó una comparación estadísticamente significativa entre la absorbancia obtenida luego del uso de los liposomas que contenían quercetina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la absorbancia en el control negativo. Como se muestra en la figura 10, la viabilidad de las neuronas en las cuales se adicionó la molécula de interés, en la concentración más baja de las que fueron planteadas, fue mucho mayor, lo que quiere decir que, la concentración de quercetina más óptima para la neuroprotección es de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que cumple su función como antioxidante y disminuye la muerte neuronal causada por el estrés oxidativo.

Otra observación que se puede hacer de este estudio es que, a medida que aumenta la concentración de antioxidante, la viabilidad es menor. Lo anterior permite asegurar que la quercetina genera toxicidad a altas concentraciones, produciendo la muerte de las neuronas. Por ello, los liposomas que contienen quercetina a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ generaron una alta toxicidad, siendo la viabilidad mucho menor incluso que en el control negativo.

La toxicidad de la quercetina a altas concentración se debe a un proceso de prooxidación de este antioxidante cuando se encuentra en concentraciones muy altas, por lo que, en lugar de disminuir el estrés oxidativo de las neuronas, está ayudando a que este se genere. Dicha afirmación se reafirma con la revisión de la literatura la cual indica que, en general, la quercetina es capaz de actuar como un prooxidante en concentraciones superiores a 40 mM, es decir, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Vargas & Burd, 2010). Es por dicha razón que se observa una disminución significativa en la viabilidad neuronal con el uso de quercetina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ encapsulada en los sistemas liposomales.

Finalmente, es importante destacar que la viabilidad de las neuronas con la quercetina a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los sistemas liposomales, es mucho menor que cuando se adicionó la solución de quercetina a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se puede suponer que el mayor grado de citotoxicidad mostrado por la quercetina cargada en los liposomas puede deberse a su proceso de internalización más fácil por parte de las células y, por ende, estas tengan un mayor acceso a la quercetina, generando su estrés oxidativo. Es bien sabido que la quercetina libre, igual que casi todos los flavonoides, no es miscible en agua, por lo que probablemente es poco biodisponibles a nivel

celular y este comportamiento puede explicar su baja citotoxicidad (Bonechi et al., 2018). Sin embargo, la diferencia entre ambas viabilidades no fue muy significativa para las otras concentraciones de quercetina utilizadas, por lo que, considerando que el uso de liposomas como portadores moleculares está de acuerdo con el deseo de permitir que los antioxidantes se internalicen mejor en las células, el uso de estos sistemas liposomales es ideal para la administración de esta molécula, siempre y cuando, esta se encuentre en las concentraciones óptimas.

4. CONCLUSIONES

- Se logró el desarrollo de los sistemas liposomales de quercetina a las concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ mediante la técnica de inyección de etanol, utilizando colesterol, epikuron 200 y epikuron 145.
- Se caracterizaron fisicoquímicamente los sistemas liposomales desarrollados mediante la técnica de dispersión de luz dinámica. Se encontró que los liposomas, en cuanto a su tamaño, se encuentran en la escala nanométrica. Además, el tamaño de los liposomas en presencia de quercetina es menor, por lo que se tiene la hipótesis de un mayor ordenamiento y rigidez en presencia de esta. Para validar dicha teoría, se recomienda realizar un estudio con microscopio electrónico de barrido para ver la forma de los liposomas control y los que contienen la molécula, y así poder observar la variación. Por otra parte, el potencial zeta de los liposomas preparados es negativo, siendo más negativos en presencia de quercetina dado al efecto electrocinético que esta les brinda gracias a su alta densidad electrónica.
- En cuanto al estudio de estabilidad, los liposomas son más inestables con el paso del tiempo, lo cual se observa con el aumento significativo de sus tamaños en los últimos días y con la disminución en la magnitud negativa de sus potenciales zeta. Para mejorar la estabilidad de estos, se recomienda el uso de tensoactivos.
- Se determinó la eficiencia de encapsulación de la quercetina en los sistemas liposomales, obteniendo que, en las concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$, la eficiencia es de 100%. Para la concentración de quercetina de 20 $\mu\text{g/mL}$, dicha eficiencia de encapsulación es menor al 50% y se propone que, a concentraciones muy altas, la quercetina se oxida, generando que no se detecte en la longitud de onda propuesta. Para corroborar lo anterior, se sugiere realizar un estudio de estabilidad química de la quercetina en los liposomas.
- Se realizó el ensayo de viabilidad para evaluar la actividad neuroprotectora de la quercetina liposomal en cultivos de neuronas hipocampales de rata. Se obtuvo que la concentración óptima de quercetina en los sistemas liposomales es de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Además, se encontró que la quercetina a concentraciones mayores de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ actúa como un prooxidante, lo que explica la baja viabilidad obtenida en los liposomas de quercetina a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a Dios por permitirme estar acá, estudiar lo que me gusta y sacar adelante mi carrera profesional. Además, le agradezco a mis padres, por inculcarme desde pequeña la importancia de la educación y dedicación en todo lo que haga y por brindarme su amor y paciencia durante todo este trayecto. En tercer lugar, a mi hermana porque ha sido mi mejor amiga a lo largo de mi vida, una gran consejera y me ha apoyado en todos mis momentos difíciles.

De igual forma, le agradezco a la Universidad Icesi por brindarme una educación de tan alta calidad y por formarme como una buena profesional, a mi tutor Cristhian Javier Yarce por la planeación de mi proyecto y su gran ayuda, a mi cotutor el profesor Álvaro Barrera por su ayuda incondicional y conocimiento compartido, y, al profesor Constain Salamanca por permitirme hacer parte del grupo de investigación de fisicoquímica farmacéutica y llevar a cabo la realización de mi proyecto de grado. Además, le quiero agradecer a Julieth Sánchez por ayudarme con sus conocimientos adquiridos en la realización de su proyecto de grado y por sacar de su tiempo para enseñarme.

Por otro lado, le agradezco a Sebastián Viteri por haber sido un apoyo incondicional tanto en mi carrera como en mi vida, acompañarme siempre y ayudarme en mis momentos tristes y difíciles. A Dayana Hurtado, Valentina Linares, Vanitty López y Sofía Pinzón les agradezco por apoyarme, corregirme y ayudarme a ser una mejor persona y profesional. Y finalmente, le agradezco a todos mis amigos, futuros químicos farmacéuticos, que fueron un gran apoyo para mí a lo largo de mi carrera e hicieron más amenos y agradables estos años.

6. REFERENCIAS

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... Nejadi-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Alzheimer Association. (2016). 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia 2016*, 12(4), 1–80. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- Ang, Y. H. (1988). Optimal adaptive transform vector quantization strategy for image coding, *25 n 13*, 225. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64010424.x>
- Ansari, M. A., Abdul, H. M., Joshi, G., Opii, W. O., & Butterfield, D. A. (2009). Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(4), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.03.002>
- Árevalo, L. M. (2016). *Modificación superficial de liposomas mediante un polímero catiónico bioadherente para la vehiculización de ampicilina*. Universidad ICESI, Cali.
- Barrera, Á., & Lopera, F. (2016). Amyloid-beta immunotherapy : the hope for Alzheimer disease ?, *47*(52).
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., ... Magnani, A. (2018). Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry*, 233(November 2017), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.11.003>
- Bureau, I. (2013). Antifungal compositions. Suiza.
- Correa, G., & Longart, M. (2010). Análisis morfométrico del proceso de diferenciación in vitro de neuronas del hipocampo. *Investigacion Clinica*, 51(4), 501–518.
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of

Neuroprotection by Quercetin : Counteracting Oxidative Stress and More, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/2986796>

Echeverri, J. D. (n.d.). *Nanoencapsulación de quercetina para optimizar su aplicación en el tratamiento de la enfermedad de alzheimer*. Universidad Icesi, Cali.

Ecocysteshop. (n.d.). Artificial Cerebrospinal Fluid Solution. Retrieved December 9, 2018, from <https://ecocysteshop.com/products/artificial-cerebrospinal-fluid-acsf-1000-ml-20x-concentrate>

Electrokinetics and Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes. (n.d.). Retrieved from <http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>

Fiorani, M., Guidarelli, A., Blasa, M., Azzolini, C., Candiracci, M., Piatti, E., & Cantoni, O. (2010). Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: Prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(5), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.014>

Gil, P. (2011). *Cultivo de células animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa* (Vision Lib). Madrid. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=nQ9ZBQAAQBAJ&pg=PA17&lpg=PA17&dq=Se+define+el+cultivo+de+células+y+tejidos+animales+como+la+técnica+mediante+la+cual+es+posible+mantener+fragmentos+de+tejidos+u+órganos,+o+incluso+células,+en+situac>

Grit, M., & Crommelin, D. J. A. (1993). Chemical-stability-of-liposomes-implications-for-their-physical-stability_1993_Chemistry-and-Physics-of-Lipids, 64, 3–18.

Huang, Y. Bin, Tsai, M. J., Wu, P. C., Tsai, Y. H., Wu, Y. H., & Fang, J. Y. (2011). Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin. *Journal of Drug Targeting*, 19(8), 709–718. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.551402>

Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A., & Fessi, H. (2010). Ethanol injection

method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research*, 20(3), 228–243. <https://doi.org/10.3109/08982100903347923>

Lemańska, K., Van Der Woude, H., Szymusiak, H., Boersma, M. G., Gliszczyńska-Swigło, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2004). The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin - A mechanistic insight. *Free Radical Research*, 38(6), 639–647. <https://doi.org/10.1080/10715760410001694062>

Maalik, A., Khan, F. A., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., Atif, M., ... Tariq, I. (2014). Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: A short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1561–1566. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.26>

Malvern Panalytical. (n.d.). Dynamic light scattering DLS. Retrieved October 16, 2018, from <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>

Martínez, A. (2009). *El Alzheimer*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Publishing Group*, 1, 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>

Materska, M. (2008). Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(4), 407–413.

Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(101), 20140459–20140459. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>

Ohannesian, L., & Streeter, A. J. (2002). *Handbook of pharmaceutical analysis*. Marcel Dekker.

Pons, M., Foradada, M., & Estelrich, J. (1993). Liposomes obtained by the ethanol injection method. *International Journal of Pharmaceutics*, 95(1–3), 51–56. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90389-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90389-W)

- Querfurth, H., & LaFerla, F. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 56–67. <https://doi.org/citeulike-article-id:6600078>
[10.1056/NEJMra0909142](https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142)
- Ukawa, M., Akita, H., Hayashi, Y., Ishiba, R., Tange, K., Arai, M., ... Harashima, H. (2014). Neutralized nanoparticle composed of SS-cleavable and pH-activated lipid-like material as a long-lasting and liver-specific gene delivery system. *Advanced Healthcare Materials*, 3(8), 1222–1229. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300629>
- Vargas, A. J., & Burd, R. (2010). Hormesis and synergy: Pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutrition Reviews*, 68(7), 418–428. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x>
- Wallace, S. J., Li, J., Nation, R. L., & Boyd, B. J. (2013). Encapsulation and Release Methodology. *Drug Deliv Transl Res*, 2(4), 284–292. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0064-4>.Drug
- Yadav, A. V., Murthy, M. S., Shete, A. S., & Sakhare, S. (2011). Stability aspects of liposomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(4), 402–413. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.01.020>

7. ANEXOS

7.1 MARCO TEÓRICO

7.1.1 Enfermedad de Alzheimer

Actualmente, la proteína beta-amiloide (A β), APOE y la proteína tau son tres elementos que tienen evidencia sustancial como contribuyentes al desarrollo de la EA. Las características neuropatológicas y neuroquímicas de la EA incluyen la pérdida sináptica y la muerte neuronal selectiva, una disminución de neurotransmisores específicos, y la presencia de depósitos proteicos anormales en las neuronas (conocidos como nudos neurofibrilares) y en el espacio extracelular (como placas difusas y neuríticas) (Masters et al., 2015).

La acumulación de la A β (llamadas placas A β) fuera de las neuronas y la acumulación de una forma anormal de la proteína tau dentro de las neuronas, son dos de varios cambios cerebrales que se cree que contribuyen al daño y la destrucción de neuronas que producen pérdida de memoria y otros síntomas de EA. A medida que los cambios cerebrales avanzan, la transferencia de información en las sinapsis comienza a fallar, el número de sinapsis disminuye, y las neuronas finalmente mueren. Se cree que la acumulación de la A β interfiere con la comunicación de neurona a neurona en las sinapsis y contribuye a la muerte celular. (Alzheimer Association, 2016).

A β es un potente veneno mitocondrial, que afecta especialmente al conjunto sináptico. En la EA, la exposición a A β inhibe las enzimas mitocondriales clave en el cerebro y en las mitocondrias aisladas. En consecuencia, el transporte de electrones, la producción de ATP, el consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial se deterioran. El aumento en la formación de radicales superóxido mitocondriales y la conversión en peróxido de hidrógeno causa estrés oxidativo, liberación de citocromo c y apoptosis (Querfurth & LaFerla, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, un compuesto antioxidante ampliamente estudiado es la quercetina, pues ha demostrado un efecto neuroprotector frente a al estrés oxidativo generado en patologías como la A β . Estudios *in vitro* en líneas celulares neuronales y en

neuronas primarias han demostrado que la quercetina, a bajas concentraciones micromolares, antagoniza la toxicidad celular inducida por diversos oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, hidroperóxido de ácido linoleico) y otras moléculas neurotóxicas que se cree que actúan induciendo el estrés oxidativo (por ejemplo, 6-hidroxiopamina y N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio) (Costa et al., 2016).

7.1.2 Quercetina como antioxidante para el tratamiento del Alzheimer

La quercetina es un flavonoide que abunda en muchas plantas étnicas, especialmente la cebolla y el té, por lo tanto, es común consumir una cantidad suficiente diariamente. La quercetina es una molécula versátil con muchas propiedades farmacológicas que incluyen antioxidantes, neurológicas, antivirales, anticancerígenas, cardiovasculares, antimicrobianas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, protectoras del sistema reproductivo y agentes antiobesidad.(Maalik et al., 2014) .

Una molécula de quercetina contiene cinco grupos hidroxilo (figura 5), cuya presencia determina la actividad biológica del compuesto y la posible cantidad de derivados. La propiedad química más ampliamente investigada de los compuestos fenólicos es su actividad antioxidante. Los antioxidantes son capaces de neutralizar los radicales libres que están siempre presentes en los alimentos, así como en las células del cuerpo humano. (Materska, 2008).

Cabe destacar que a pesar de la presencia de los cinco grupos hidroxilo, la molécula de quercetina tiene un carácter lipofílico gracias a sus anillos aromáticos, por lo que presenta problemas de solubilidad en agua y, por tanto, en su biodisponibilidad (Materska, 2008). Por lo anterior, se deben emplear estrategias que ayuden a solubilizar la molécula en medio acuoso. Una de ellas es el uso de la nanotecnología, específicamente el desarrollo de liposomas, los cuales permiten encapsular el fármaco y, por ende, obtener su correcta solubilización y protección frente a degradación.

7.1.3 Liposomas

7.1.3.1 Generalidades

Los liposomas son pequeñas vesículas creadas artificialmente de forma esférica formadas por fosfolípidos y otros compuestos como el colesterol. Debido a su tamaño y carácter hidrofóbico e hidrofílico (además de la biocompatibilidad), son sistemas prometedores para la administración de fármacos poco solubles. Las propiedades de estos nanosistemas difieren considerablemente con la composición de los lípidos, la carga superficial, el tamaño y el método de preparación. Generalmente, son definitivos como vesículas esféricas con tamaños de partículas que varían desde 30 nm hasta varios micrómetros y los grupos de cabeza polar están orientados en dirección de las fases acuosas interior y exterior (Figura 11A) (Akbarzadeh et al., 2013).

7.1.3.2 Clasificación

El tamaño del liposoma puede variar desde vesículas muy pequeñas (0.025 μm) hasta grandes (2.5 μm). Además, pueden tener membranas de una o dos capas. El tamaño de la vesícula es un parámetro agudo para determinar la vida media de la circulación de los liposomas, y tanto el tamaño como el número de bicapas afectan la cantidad de encapsulación del fármaco en la estructura. Sobre la base de su tamaño y número de bicapas, los liposomas también se pueden clasificar bajo las siguientes categorías: (1) vesículas multilamelares (MLV) y (2) vesículas unilaminares. Las vesículas unilaminares, a su vez, se pueden clasificar en dos categorías: (1) vesículas unilaminares grandes (LUV) y (2) vesículas unilamelares pequeñas (SUV). En los liposomas unilamelares, la vesícula tiene una sola esfera bicapa de fosfolípidos que encierra la solución acuosa. En los multilaminares, las vesículas tienen una estructura de cebolla. Clásicamente, varias vesículas unilaminares se formarán en el interior del otro con un tamaño más pequeño, formando una estructura multilaminar de esferas concéntricas de fosfolípidos separadas por capas de agua (figura 11B) (Akbarzadeh et al., 2013)

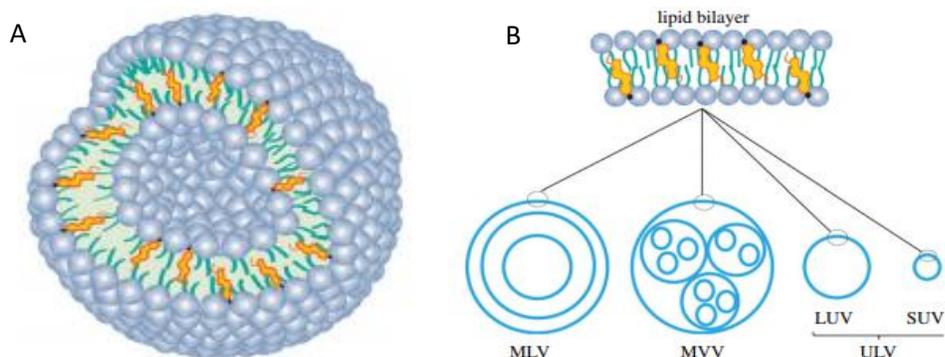


Figura 11. Liposomas A) Estructura B) Clasificación (Monteiro et al., 2014)

7.1.3.3 Inyección de etanol

Existen diversas técnicas para la preparación de los sistemas liposomales, una de ellas es la inyección de etanol la cual será usada en este proyecto. En dicho método, una solución de etanol que contiene los lípidos se inyecta rápidamente a través de una aguja fina en un exceso de una solución buffer u otro medio acuoso que generalmente incluye el principio activo solubilizado. La fuerza de la inyección suele ser suficiente para lograr una mezcla completa, de modo que el etanol se diluye casi instantáneamente en agua, lo que da lugar a que las moléculas de fosfolípidos se agrupen uniformemente por todo el medio formando vesículas y encapsulando al principio activo en el interior de las mismas (Ukawa et al., 2014). Posteriormente, se realizan procesos de ultrafiltración y purificación de los liposomas formados, con el objetivo de determinar la eficiencia de encapsulación del compuesto funcional (Wallace, Li, Nation, & Boyd, 2013). Cabe considerar que el porcentaje de encapsulación es extremadamente bajo si los materiales a atrapar se disuelven en la fase acuosa. La presencia de etanol también puede ser una desventaja, pero esto puede eliminarse fácilmente por ultrafiltración (Pons, Foradada, & Estelrich, 1993).

Para determinar el porcentaje de encapsulación del fármaco en los sistemas liposomales se utiliza la ultrafiltración, seguida de la espectrofotometría de UV-Vis.

7.1.4 Espectrofotometría UV-Vis

La absorción de radiación electromagnética de longitudes de onda entre 200 y 800nm por moléculas que tienen electrones π o átomos que poseen pares de electrones no compartidos que pueden emplearse para análisis tanto cualitativos como cuantitativos; como tal, se conoce como espectrofotometría. Dado que una amplia variedad de sustancias farmacéuticas absorben el espectro electromagnético, la técnica se utiliza ampliamente en dicho ámbito (Ohannesian & Streeter, 2002).

La relación entre la concentración del analito y la intensidad de la luz absorbida es la base de las aplicaciones cuantitativas de la espectrofotometría. Además, las características de los espectros de absorción tales como la absorptividad molar, la posición espectral y la forma y amplitud de la banda de absorción están relacionadas con la estructura molecular y el entorno y, por lo tanto, pueden utilizarse para el análisis cualitativo. La absorción de luz ultravioleta o visible por las moléculas se produce como resultado de la interacción del campo eléctrico asociado con una onda de luz o un fotón con electrones moleculares. La intensidad, la posición en el espectro y la apariencia de la banda espectral producida por interacción depende de las energías de los electrones moleculares y de las características dinámicas con respecto al resto de la molécula (Ohannesian & Streeter, 2002).

7.1.5 Caracterización fisicoquímica de los liposomas

7.1.5.1 Potencial Z

El potencial zeta es un parámetro analítico e instrumental, que se utiliza para medir la intensidad de la interacción electrostática repulsiva entre partículas coloidales cargadas naturalmente. De hecho, las mediciones de potencial z se usan comúnmente para predecir la estabilidad de los sistemas coloidales. Si todas las partículas en una suspensión tienen un gran potencial zeta negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí y, por lo tanto, no habrá tendencia a agregarse. Por lo general, las partículas con potenciales zeta más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV se consideran estables (Monteiro et al., 2014).

Para entender más a fondo este concepto se debe considerar el modelo de la doble capa. Teniendo en cuenta un coloide de carga negativa, se debe observar el efecto del coloide sobre el ion positivo (contra-ion) en la solución. Inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una capa rígida adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como *capa de Stern* (Electrokinetics and Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, n.d.).

Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una *capa difusa* de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones. Por otra parte, en la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones ya que tienen la misma carga del coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse del coloide, mientras que las fuerzas repulsivas del coloide son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa conforman la *doble capa* (figura 12) (Electrokinetics and Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, n.d.).

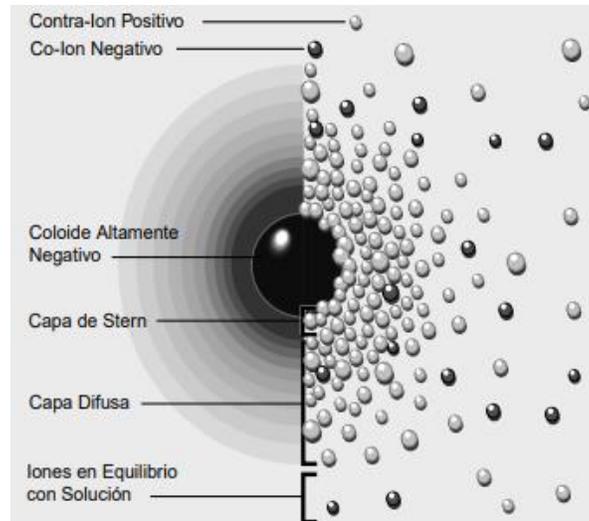


Figura 12. Visualización de la doble capa (Electrokinetics and Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, n.d.).

La doble capa se forma para neutralizar el coloide cargado y, a su vez, provoca un potencial electrocinético entre la superficie del coloide y cualquier punto de la masa del líquido en suspensión. Esta diferencia de voltaje es del orden de milivoltios y se conoce como potencial de superficie. La magnitud del potencial de superficie está relacionada con la carga de la superficie y el espesor de la doble capa. A medida que se sale de la superficie, el potencial cae de forma aproximadamente lineal en la capa Stern y luego exponencialmente a través de la capa difusa, acercándose a cero en el límite imaginario de la capa doble (Electrokinetics and Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, n.d.).

Una partícula cargada se moverá con una velocidad fija en un campo de voltaje. Este fenómeno se llama electroforesis. La movilidad de la partícula está relacionada con la constante dieléctrica y la viscosidad del líquido en suspensión y con el potencial eléctrico en el límite entre la partícula en movimiento y el líquido. Este límite se denomina plano de deslizamiento y generalmente se define como el punto donde se encuentran la capa Stern y la capa difusa. Se considera que la capa Stern está rígidamente unida al coloide, mientras que la capa difusa no lo está. Como resultado, el potencial eléctrico en esta unión está relacionado con la movilidad de la partícula y se denomina potencial zeta (figura 13) (Electrokinetics and

Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, n.d.).

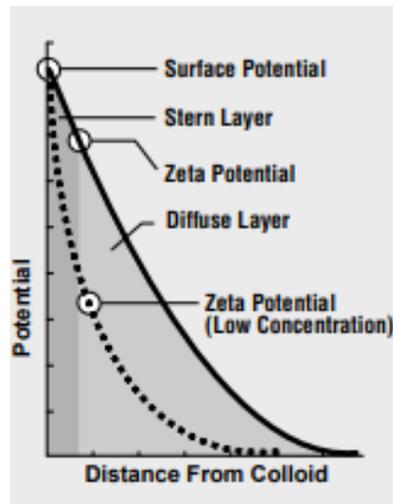


Figura 13. Potencial Z vs Potencial de superficie (Electrokinetics and Colloid Behavior The Interaction of Colloids Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, n.d.).

7.1.5.2 Tamaño de partícula

La dispersión de luz dinámica (DLS), a veces denominada espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elástica, es una técnica que permite la medición del tamaño de partículas en el rango submicrométrico. Típicamente, las mediciones del tamaño de partícula se toman entre 2 y 5 minutos, lo que permite que el DLS se clasifique como una técnica rápida. Para proceder con el análisis de DLS, las partículas (hasta decenas de miles) se suspenden en una solución y se iluminan con luz para que las partículas dispersen la luz en un índice de refracción dado, diferente de la del disolvente de suspensión. Por lo tanto, los liposomas se miden en su estado natural, sin la necesidad de deshidratación o tinción (Monteiro et al., 2014).

Las aplicaciones típicas de la dispersión dinámica de la luz son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El movimiento browniano de partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse a diferentes intensidades. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad produce la

velocidad del movimiento browniano y, por lo tanto, el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein (Malvern Panalytical, n.d.).

7.1.6 Ensayos in vitro en cultivos primarios de células de hipocampo de ratas

Se define el cultivo de células y tejidos animales como la técnica mediante la cual es posible mantener fragmentos de tejidos u órganos, o incluso células, en situación de aislamiento de un organismo pluricelular. Pero para que la técnica pueda ser considerada como válida y útil, para experimentación u otras aplicaciones, es necesario que dichos tejidos o células realicen al menos una parte de las funciones que tenían en el organismo completo (Gil, 2011).

Los cultivos neuronales del sistema nervioso central (SNC) se han venido usando ampliamente para el estudio de los mecanismos que conducen el proceso de diferenciación neuronal, así como también se han empleado como modelos in vitro para evaluar fármacos y desarrollar nuevas terapias. En principio, los cultivos neuronales primarios pueden prepararse de cualquier región del cerebro, sin embargo, el hipocampo representa una de las regiones del cerebro más utilizada debido a que su población neuronal es bastante homogénea. La población neuronal del hipocampo está representada por las neuronas piramidales las cuales a su vez representan de 85% a 90% de la población total de neuronas del SNC. Adicionalmente, las neuronas piramidales en cultivo expresan muchas de las características fenotípicas propias de estas células, como son el desarrollo de un axón simple, una larga dendrita apical y numerosas dendritas basales más cortas; en general estas células mantienen su identidad en cultivos in vitro, lo que hace a estos cultivos excelentes modelos para el estudio del funcionamiento del SNC (Correa & Longart, 2010).

7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA

Tabla 3. Absorbancia obtenida a diferentes concentraciones de quercetina

Concentración de quercetina (ppm)	Absorbancia		
	1	2	3
1,5	0,036	0,027	0,03
3	0,068	0,075	0,07
6	0,145	0,147	0,154
12	0,32	0,318	0,342
24	0,663	0,649	0,648

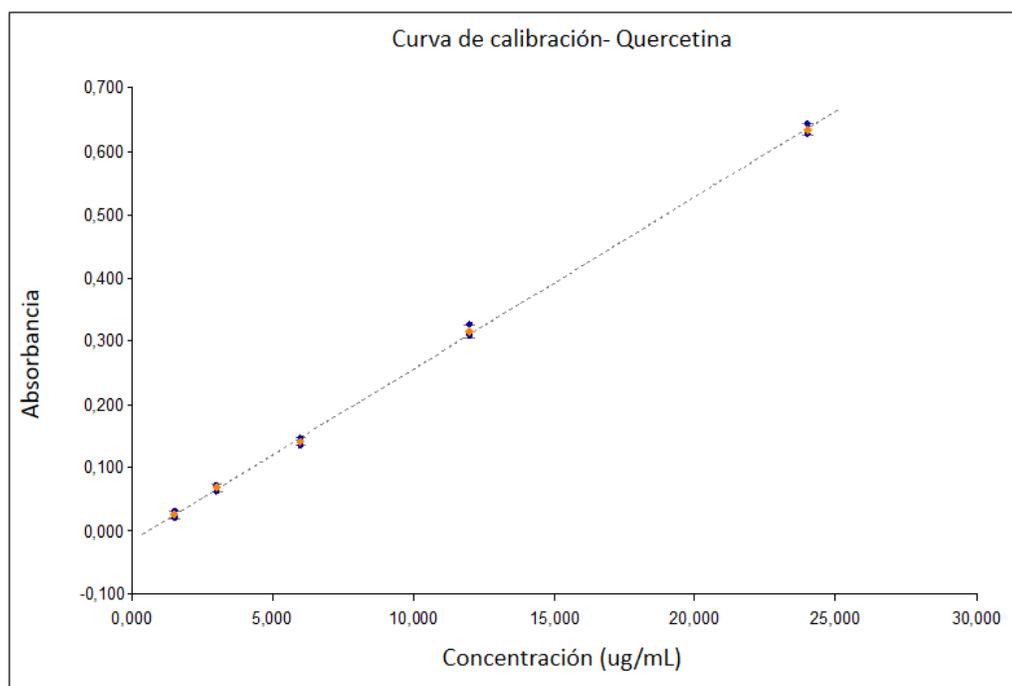


Figura 14. Curva de calibración obtenida para la quercetina

Tabla 4. Ecuación de la recta y coeficiente de correlación de la curva de calibración.

Ecuación de la recta	A	B	R2
$Y=A*X+B$	0,0272	-0,0154	1

7.3 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

Tabla 5. Tamaño de partícula promedio y potencial zeta promedio de los sistemas liposomales a diferentes concentraciones de quercetina con el paso del tiempo.

Concentración quercetina (µg/mL)	Día	Tamaño de partícula promedio (nm)			Potencial zeta promedio (mV)		
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0 (liposomas control)	1	125,90	142,10	126,65	-10,035	-14,5	-15,6
	2	262,95	254,5	398,85	-12,85	-16,10	-15,15
	3	1071,2	496,7	776,9	-14,5	-15,65	-15,65
	4	816,2	506,6	661,4	-18,8	-19,9	-19,3
	5	1153	2230	1182,5	-16,8	-8,98	-10,05
	6	2144	5257	1102,5	-13,75	-10,04	-15,35
5	1	120,63	129,25	115,90	-8,24	-15,10	-16,05
	2	165,25	215,65	268,25	-13,85	-11,38	-40,45
	3	243,20	260,80	420,45	-12,80	-17,85	-19,00
	4	338,30	310,30	324,30	-14,40	-12,80	-13,60
	5	1357,00	3952,50	407,30	-5,65	-19,25	-21,70
	6	2101,50	1198,50	368,10	-5,50	-19,10	-12,25
10	1	253,95	148,75	127,80	-13,20	-26,40	-23,05
	2	383,20	280,75	139,60	-21,40	-22,35	-22,15
	3	342,90	631,30	238,75	-16,95	-10,24	-21,90
	4	496,40	487,00	491,70	-18,20	-18,70	-18,45
	5	863,65	2510,50	488,40	-17,30	-13,55	-28,80
	6	1197,00	993,30	3321,50	-11,40	-15,05	-9,72
<i>Continúa en la siguiente página...</i>							

Viene de la página ...

Concentración quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Día	Tamaño de partícula promedio (nm)			Potencial zeta promedio (mV)		
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
20	1	220,35	357,05	232,70	-24,55	-27,55	-16,45
	2	359,75	232,25	229,80	-25,40	-33,40	-20,30
	3	421,10	251,50	266,90	-18,90	-19,15	-19,55
	4	337,10	309,40	323,25	-20,10	-20,00	-20,05
	5	585,30	2428,00	252,70	-22,50	-15,90	-16,55
	6	1007,90	3126,50	376,20	-14,55	-12,95	-12,40

7.4 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Tabla 6. Concentraciones obtenidas a partir de la ecuación de la recta y porcentaje de eficiencia de encapsulación de los sistemas liposomales

Muestra	Concentración de quercetina teorica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de quercetina encapsulada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de quercetina no encapsulada ($\mu\text{g/mL}$)	% Eficiencia de encapsulación
1	5	4,9412	0	100%
1		4,7941	0	100%
1		4,4632	0	100%
2		6,5960	0	100%
2		6,4040	0	100%
2		6,2647	0	100%
<i>Continúa en la siguiente página...</i>				

Viene de la página ...

Muestra	Concentración de quercetina teorica (µg/mL)	Concentración de quercetina encapsulada (µg/mL)	Concentración de quercetina no encapsulada (µg/mL)	% Eficiencia de encapsulación
3	10	11,118	0	100%
3		10,272	0	100%
3		10,162	0	100%
4		11,118	0	100%
4		10,934	0	100%
4		11,522	0	100%
5	20	7,299	0	<50%
5		7,354	0	<50%
5		6,989	0	<50%
6		4,831	1,706	<50%
6		7,331	1,632	<50%
6		4,509	1,779	<50%

7.5 ENSAYOS DE VIABILIDAD

7.5.1 Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad

Tabla 7. Absorbancias obtenidas en el ensayo de viabilidad neuronal

Absorbancia										
Neurobasal	TritonX-100 0,1%	ASCF (Veh)	Glu 50 uM	Liposomas	Que 5 µg/mL	Que 5 µg/mL	Que 10 µg/mL	Que 10 µg/mL	Que 20 µg/mL	Que 20 µg/mL
0,600	-0,013	0,331	0,391	0,380	0,577	0,472	0,460	0,465	0,465	0,284
0,651	0,013	0,496	0,397	0,584	0,532	0,541	0,407	0,487	0,315	0,220
0,643	0,050	0,366	0,395	0,470	0,528	0,578	0,474	0,408	0,415	0,214
0,554	0,040	0,432	0,437	0,536	0,570	0,576	0,440	0,430	0,500	0,193
0,584	0,043	0,416	0,310	0,507	0,508	0,490	0,414	0,408	0,324	0,184
0,632	0,060	0,603	0,485	0,459	0,553	0,474	0,381	0,319	0,271	0,141
0,632	0,045	0,571	0,559	0,366	0,495	0,412	0,388	0,244	0,232	0,226
0,598	-0,001	0,358	0,501	0,362	0,372	0,417	0,340	0,249	0,273	0,180

Tabla 8. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Signific ant?	Summa ry	Adjusted P Value
Neurobasal vs. TritonX-100 0,1%	0,5821	0,5199 to 0,6444	Yes	****	<0,0001
Neurobasal vs. ASCF (Veh)	0,1651	0,01896 to 0,3113	Yes	*	0,0271
<i>Continúa en la siguiente página ...</i>					

Viene de la página ...

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Neurobasal vs. Glu 50 uM	0,1774	0,05373 to 0,301	Yes	**	0,0073
Neurobasal vs. Liposomas	0,1538	0,01242 to 0,2951	Yes	*	0,0329
Neurobasal vs. Que 5 µg/mL	0,0948	-0,02123 to 0,211	No	ns	0,1232
Neurobasal vs. Que+L 5 µg/mL	0,1168	-0,001006 to 0,2345	No	ns	0,0521
Neurobasal vs. Que 10 µg/mL	0,1988	0,1091 to 0,2884	Yes	***	0,0005
Neurobasal vs. Que+L 10 µg/mL	0,2355	0,07426 to 0,3967	Yes	**	0,0065
Neurobasal vs. Que 20 µg/mL	0,2624	0,07517 to 0,4496	Yes	**	0,0083
Neurobasal vs. Que+L 20 µg/mL	0,4065	0,3251 to 0,4879	Yes	****	<0,0001
TritonX-100 0,1% vs. ASCF (Veh)	-0,417	-0,5548 to -0,2792	Yes	****	<0,0001
TritonX-100 0,1% vs. Glu 50 uM	-0,4048	-0,5308 to -0,2787	Yes	****	<0,0001
TritonX-100 0,1% vs. Liposomas	-0,4284	-0,5535 to -0,3032	Yes	****	<0,0001
TritonX-100 0,1% vs. Que 5 µg/mL	-0,4873	-0,5877 to -0,3868	Yes	****	<0,0001

Continúa en la siguiente página ...

Viene de la página ...

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
TritonX-100 0,1% vs. Que+L 5 µg/mL	-0,4654	-0,5652 to -0,3655	Yes	****	<0,0001
TritonX-100 0,1% vs. Que 10 µg/mL	-0,3834	-0,4622 to -0,3045	Yes	****	<0,0001
TritonX-100 0,1% vs. Que+L 10 µg/mL	-0,3466	-0,5093 to -0,1839	Yes	***	0,0006
TritonX-100 0,1% vs. Que 20 µg/mL	-0,3198	-0,4883 to -0,1512	Yes	**	0,0013
TritonX-100 0,1% vs. Que+L 20 µg/mL	-0,1756	-0,2727 to -0,07856	Yes	**	0,0018
ASCF (Veh) vs. Glu 50 uM	0,0123	-0,1322 to 0,1567	No	ns	>0,9999
ASCF (Veh) vs. Liposomas	-0,0114	-0,2014 to 0,1786	No	ns	>0,9999
ASCF (Veh) vs. Que 5 µg/mL	-0,0703	-0,2434 to 0,1029	No	ns	0,7513
ASCF (Veh) vs. Que+L 5 µg/mL	-0,0484	-0,2544 to 0,1577	No	ns	0,9838
ASCF (Veh) vs. Que 10 µg/mL	0,0336	-0,1642 to 0,2314	No	ns	0,9984

Continúa en la siguiente página ...

Viene de la página ...

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
ASCF (Veh) vs. Que+L 10 µg/mL	0,0704	-0,182 to 0,3228	No	ns	0,9544
ASCF (Veh) vs. Que 20 µg/mL	0,0973	-0,1839 to 0,3784	No	ns	0,8667
ASCF (Veh) vs. Que+L 20 µg/mL	0,2414	0,04345 to 0,4393	Yes	*	0,0181
Glu 50 uM vs. Liposomas	-0,0236	-0,2481 to 0,2008	No	ns	>0,9999
Glu 50 uM vs. Que 5 µg/mL	-0,0825	-0,2692 to 0,1042	No	ns	0,6727
Glu 50 uM vs. Que+L 5 µg/mL	-0,0606	-0,2598 to 0,1386	No	ns	0,9272
Glu 50 uM vs. Que 10 µg/mL	0,0214	-0,1515 to 0,1942	No	ns	0,9999
Glu 50 uM vs. Que+L 10 µg/mL	0,0581	-0,1991 to 0,3154	No	ns	0,9874
Glu 50 uM vs. Que 20 µg/mL	0,085	-0,1559 to 0,3259	No	ns	0,8548
Glu 50 uM vs. Que+L 20 µg/mL	0,2291	0,0794 to 0,3789	Yes	**	0,0050
Liposomas vs. Que 5 µg/mL	-0,0589	-0,1836 to 0,06586	No	ns	0,6061
Liposomas vs. Que+L 5 µg/mL	-0,037	-0,1175 to 0,04351	No	ns	0,6335

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página ...

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Liposomas vs. Que 10 µg/mL	0,045	-0,08335 to 0,1733	No	ns	0,8587
Liposomas vs. Que+L 10 µg/mL	0,0818	-0,03013 to 0,1936	No	ns	0,1896
Liposomas vs. Que 20 µg/mL	0,1086	-0,06418 to 0,2814	No	ns	0,3112
Liposomas vs. Que+L 20 µg/mL	0,2528	0,09296 to 0,4125	Yes	**	0,0041
Que 5 µg/mL vs. Que+L 5 µg/mL	0,0219	-0,07282 to 0,1166	No	ns	0,9854
Que 5 µg/mL vs. Que 10 µg/mL	0,1039	0,03417 to 0,1736	Yes	**	0,0058
Que 5 µg/mL vs. Que+L 10 µg/mL	0,1406	0,03205 to 0,2492	Yes	*	0,0130
Que 5 µg/mL vs. Que 20 µg/mL	0,1675	0,0409 to 0,2941	Yes	*	0,0115
Que 5 µg/mL vs. Que+L 20 µg/mL	0,3116	0,2068 to 0,4164	Yes	****	<0,0001
Que+L 5 µg/mL vs. Que 10 µg/mL	0,082	0,01018 to 0,1538	Yes	*	0,0257
Que+L 5 µg/mL vs. Que+L 10 µg/mL	0,1188	0,01989 to 0,2176	Yes	*	0,0196

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página ...

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Que+L 5 µg/mL vs. Que 20 µg/mL	0,1456	0,03309 to 0,2582	Yes	*	0,0130
Que+L 5 µg/mL vs. Que+L 20 µg/mL	0,2898	0,1689 to 0,4106	Yes	***	0,0003
Que 10 µg/mL vs. Que+L 10 µg/mL	0,0368	-0,07137 to 0,1449	No	ns	0,8766
Que 10 µg/mL vs. Que 20 µg/mL	0,0636	-0,04324 to 0,1705	No	ns	0,3631
Que 10 µg/mL vs. Que+L 20 µg/mL	0,2078	0,1436 to 0,2719	Yes	****	<0,0001
Que+L 10 µg/mL vs. Que 20 µg/mL	0,0269	-0,09047 to 0,1442	No	ns	0,9862
Que+L 10 µg/mL vs. Que+L 20 µg/mL	0,171	0,0367 to 0,3053	Yes	*	0,0143
Que 20 µg/mL vs. Que+L 20 µg/mL	0,1441	0,003918 to 0,2843	Yes	*	0,0437

Tabla 9. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de viabilidad neuronal

Absorbancia										
Neurobasal	TritonX-100 0,1%	ASCF (Veh)	Glu 50 uM	Liposomas	Que 5 µg/mL	Que+L 5 µg/mL	Que 10 µg/mL	Que+L 10 µg/mL	Que 20 µg/mL	Que+L 20 µg/mL
0,257	-0,004	0,335	0,318	0,217	0,344	0,388	0,319	0,243	0,278	0,221
0,4	0,009	0,317	0,305	0,188	0,409	0,334	0,3	0,255	0,274	0,18
0,501	0,01	0,275	0,316	0,178	0,291	0,327	0,351	0,24	0,353	0,174
0,356	0,005	0,265	0,234	0,192	0,354	0,319	0,261	0,25	0,295	0,157
0,392	0,007	0,261	0,274	0,185	0,296	0,301	0,301	0,229	0,263	0,198
0,371	0,019	0,234	0,259	0,201	0,385	0,337	0,327	0,265	0,201	0,167
0,396	0,018	0,225	0,254	0,243	0,302	0,282	0,255	0,256	0,275	0,143
0,438	0,009	0,25	0,193	0,213	0,301	0,321	0,283	0,232	0,198	0,15

Tabla 10. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Glu 50 uM vs. Liposomas	0,067	0,001639 to 0,1324	Yes	*	0,0448
Glu 50 uM vs. Que 5 µg/mL	-0,06613	-0,1335 to 0,001226	No	ns	0,0542
Glu 50 uM vs. Que+L 5 µg/mL	-0,057	-0,1049 to -0,009064	Yes	*	0,0223
Glu 50 uM vs. Que 10 µg/mL	-0,0305	-0,07122 to 0,01022	No	ns	0,1533
Glu 50 uM vs. Que+L 10 µg/mL	0,02288	-0,03016 to 0,07591	No	ns	0,5723
Glu 50 uM vs. Que 20 µg/mL	0,002	-0,04699 to 0,05099	No	ns	0,9998
Glu 50 uM vs. Que+L 20 µg/mL	0,09538	0,05791 to 0,1328	Yes	***	0,0003

7.5.2 Composición de los medios utilizados en el cultivo

Tabla 11. Componentes del medio de cultivo

Componente	Cantidad
MEM con Glutamax	50 mL
Solución Penicilina/Estreptomicina	1 mL
Hepes	No aplica
Suero de caballo al 25%	50 mL
Solución Hank al 25% con D-glucosa	50 mL
Agua destilada	200 mL

Tabla 12. Componentes del medio de disección

Componente	Cantidad
MEM	50 mL
Solución Penicilina/Estreptomicina	1 mL
Trix (Hidroximetil) aminometano	120 mg
Solución acuosa de NaHCO ₃ 7,5%	910 µL
Suero de caballo	50 mL
Solución Hank al 25% con D-glucosa	50 mL
Agua destilada	100 mL

7.5.3 Reacción de la conversión de MTT en formazán

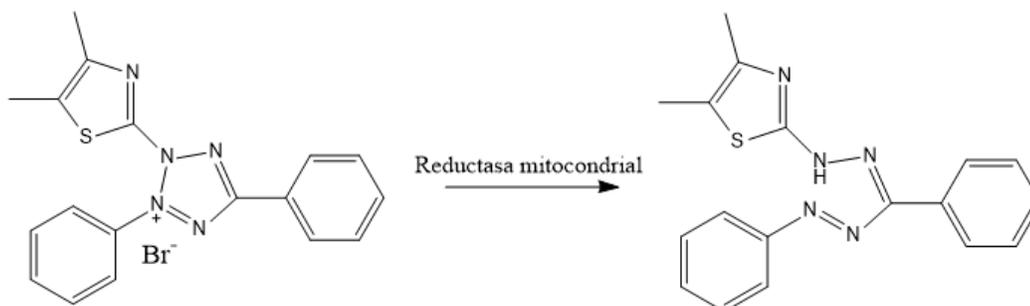


Figura 15. Conversión de MTT en formazán

7.6 APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN



Santiago de Cali, 27 de abril de 2017
CIECUAE 0021/2017

Dr. Alvaro Andres Barrera Ocampo
Investigador Principal- Universidad Icesi

ASUNTO: Aprobación de Proyecto de Investigación

El 24 de abril del presente año, el Comité de Ética Animal CIECUAE de la Universidad Icesi dando cumplimiento a la ley 84 de 1989 y a la resolución de rectoría N° 847 (9 de julio de 2012), aprobó el siguiente proyecto de investigación:

"Determinación de las bases moleculares de la vulnerabilidad del hipocampo en la enfermedad de Alzheimer"

La presente se firma, el día (27), mes (abril), del año (2017)

Cordialmente,

Juliana Rengifo, PhD
Presidente –CIECUAE
Universidad Icesi

Figura 16. Acta de aprobación del Comité de Ética