

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



Evaluación de nanopartículas de quercetina: efecto antioxidante en células vivas y efecto anti-inflamatorio en un modelo de DT2 en *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M.C. ALDO LEYVA SOTO

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez

Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy

SINODALES:

Dr. Nicolás Andrés Tobar Bächler

Dra. Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz

Dr. Omar Hugo Porras Espinoza

HOJA DE APROBACIÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.354
Tijuana, B.C., a 24 de noviembre, 2023

C. ALDO LEYVA SOTO
Pasante de: Doctorado en Ciencias
Presente


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

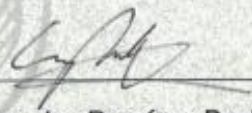
Es propuesto, por las C. Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez y
Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy

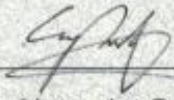
Quiénes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema: "Evaluación de nanopartículas de quercetina: efecto antioxidante de células
vivas y efecto anti-inflamatorio en un modelo DT2 en *Drosophila melanogaster*"

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

- I. INTRODUCCIÓN
- II. MATERIALES Y MÉTODOS
- III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- IV. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO
- V. ANEXOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Directora De Tesis


Dra. Rocío Alejandra Chávez
Santoscoy
Co-Directora De Tesis



“El éxito no es un accidente, es trabajo duro, perseverancia, aprendizaje, estudio, sacrificio y, sobre todo, amar lo que estás haciendo...”

ÍNDICE GENERAL

	Página
Hoja de aprobación	II
Lista de tablas	VI
Lista de figuras	VI
Agradecimientos	VIII
Resumen	XI
Abstract	XII
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Marco teórico	2
1.2 Inflamación y Síndrome Metabólico	2
1.3 Los flavonoides	3
1.3.1 Quercetina	6
1.4 Inulina	7
1.5 Nanotecnología en la industria alimentaria	8
1.6 Nanopartículas poliméricas	9
1.7 Nanoencapsulación de quercetina	10
1.8 El modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.8.1 Morfología	13
1.8.2 Reproducción y ciclo de vida	14
1.8.3 <i>D. melanogaster</i> como modelo de enfermedades	14
1.9 Cultivo celular	18
1.9.1 Células Caco-2	19
1.9.2 Células Huh-7	19
1.10 Hipótesis	20
1.11 Justificación	20
1.12 Objetivo general	22
1.13 Objetivos específicos	22

CAPÍTULO II	MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1	Reactivos y sales	24
2.2	Cultivo celular	24
2.3	Monitoreo de Ca ²⁺ intracelular	24
2.4	Producción e infección de partículas adenovirales	25
2.5	Registro e imágenes	25
2.6	Ensayo MTT	26
2.7	Modelo animal y grupos experimentales	27
2.8	Composición de las condiciones dietarias	27
2.9	Definición de la muestra	28
2.10	Ensayo de ingesta	28
2.11	Medición de peso	29
2.12	Medición de glicemia en larvas y moscas adultas	30
2.13	Ensayo de sobrevida	31
2.14	Ensayo de triglicéridos totales	31
2.15	Extracción de ARN y expresión génica	32
2.16	Secuencia de partidores utilizados	34
2.17	Técnicas estadísticas de análisis	35
CAPÍTULO III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1	Evaluación del impacto redox intracelular	37
3.2	Medición de los niveles de Ca ²⁺ intracelular	46
3.3	Viabilidad Celular	48
3.4	Ensayos en <i>Drosophila melanogaster</i>	53
3.4.1	Glicemias	53
3.4.2	Ingesta	56
3.4.3	Peso	61
3.4.4	Sobrevida	64
3.4.5	Contenido Total de Triglicéridos (TAG's)	66
3.4.6	Expresión Genética	68
3.5	Discusión final de resultados	80
CAPÍTULO IV	CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	83
CAPÍTULO V	ANEXOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABLAS

CONTENIDO		Página
Tabla 1.	Grupos de intervención dietaria	27
Tabla 2.	Marcadores evaluados y sus homólogos	33
Tabla 3.	Secuencias de partidores utilizados	34

LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO		Página
Figura 1.	Estructura básica de los flavonoides y sus clases	5
Figura 2.	Evolución temporal de la señal del biosensor HyPer	37
Figura 3.	Gráficas comparativas, efecto agudo 10 nM, 100 nM y 1 μ M	38
Figura 4A.	Efecto 2.5 μ M en la señal de HyPer	39
Figura 4B.	Efecto 2.5 μ M en la actividad antioxidante	39
Figura 5A.	Efecto 10 μ M en la señal de HyPer	40
Figura 5B.	Efecto 10 μ M en la actividad antioxidante	40
Figura 6A.	Efecto 100 μ M en la señal de HyPer	40
Figura 6B.	Efecto 100 μ M en la actividad antioxidante	40
Figura 7.	Comparación de señal basal en estado redox, 100 μ M	41
Figura 8A.	Tasas de recuperación efecto agudo	43
Figura 8B.	Tasas de recuperación efecto crónico	43
Figura 9A.	Actividad antioxidante de dosis mínimas	44
Figura 9B.	Actividad antioxidante de dosis máximas	44
Figura 10.	Registros de evolución temporal de FURA-2	47
Figura 11.	Viabilidad celular, Caco-2, 24 y 48 horas	49
Figura 12.	Viabilidad celular, Huh-7, 24 y 48 horas	51
Figura 13.	Glicemias L3	54
Figura 14.	Glicemias moscas adultas 10 días	54
Figura 15.	Glicemias en moscas + 10 días como adulto	55
Figura 16.	Ingesta, L3-seis condiciones dietarias	57
Figura 17.	Razones L3	58
Figura 18.	Calorías L3	58
Figura 19.	Ingesta, moscas adultas-seis condiciones dietarias	59
Figura 20.	Razones moscas adultas	60
Figura 21.	Calorías moscas adultas	60
Figura 22.	Pesos L3	62
Figura 23.	Pesos moscas adultas	62

Figura 24.	Curva de sobrevivencia	64
Figura 25.	TAG's totales L3	66
Figura 26.	TAG's totales moscas adultas	67
Figura 27.	Expresión marcadores resistencia insulina, L3	70
Figura 28.	Expresión marcadores resistencia insulina, adultos	71
Figura 29.	Expresión marcadores inflamación, L3	74
Figura 30.	Expresión marcadores inflamación, adultos	75
Figura 31.	Expresión marcadores antioxidantes, L3	76
Figura 32.	Expresión marcadores antioxidantes, adultos	77

AGRADECIMIENTOS

En este viaje, he aprendido que el conocimiento es un regalo que se multiplica cuando se comparte y ese regalo nadie te lo puede arrebatar. Ser agradecido es un acto de humildad que nos conecta con lo esencial de la vida y es una virtud que engrandece tanto al que da como al que recibe.

Inicio estos mensajes de agradecimiento con el más grande, que es para mi madre Mara Soto, gracias por estar, por preocuparse, por su paciencia, pero sobre todo, por el amor y la voluntad para alentarme y motivándome para seguir creciendo.

Gracias a la persona que está conmigo desde que inició el proyecto Doctoral, mi pareja, mi amor, Carlos Iván Zavala, testigo de todas las adversidades, de las luchas, de los días buenos y los no tan buenos, de los logros, de los desvelos, de aprendizaje, por la motivación y todo el amor, te amo vida.

Gracias infinitas a la Dra. Ana Ramírez, por todo el apoyo, por sus palabras de aliento cuando yo no veía las cosas claras en esta travesía, por la motivación, las correcciones, la guía, la paciencia, el optimismo y por la semilla de la curiosidad que sembró en mi a través de estos cuatro años.

Dra. Rocío Chávez, gracias por guiarme por el buen camino, por el apoyo y la disposición para que se cumplieran los objetivos de este proyecto.

Dra. Lilián Muñoz, gracias por la asesoría, la guía y por el apoyo brindado durante este proyecto doctoral, alentándome siempre a seguir firme a cumplir con los objetivos.

Para el equipo del laboratorio de Biología Celular y Molecular del INTA en Santiago de Chile, dirigido por el Dr. Nicolás Tobar, Samantha Rhein, Ma. Jesús Vera, Pamela Marinao, Paulina Hernández, Marcela Oviedo, ¡gracias totales! Por todo el amor, por hacerme sentir en casa, por el apoyo, los almuerzos ricos y no tan ricos, los cafés, los postres, por hacer de mi estancia días felices, llenos de aprendizajes, de crecimiento personal y profesional, atesoro en mi alma a tan bellas personas.

Dr. Omar Porras, Miltha Hidalgo, a todo el equipo del LINF en Santiago de Chile, les agradezco su infinita paciencia, la sabiduría compartida, la guía y los aprendizajes que conservo conmigo y que deseo poder compartirlos, los tengo en mi corazón desde el 2018, gracias por cobijarme y hacerme sentir tan querido.

Gracias a mi señor Padre Aldo Leyva, a mis viejos de oro, Manuel Leyva, Andrea Cota, Rosa Graciano, personas que siempre me han cuidado, sus canas son sinónimo de sabiduría y me han enseñado tanto, que ese amor que siento cada vez que los abrazo me mantiene fuerte y vivo.

A mis hermanos Mariela y Emanuel, a mis tías, mis primos, en general, a toda la familia que han estado de manera incondicional brindándome su amor y siendo partícipes de todos mis proyectos.

Agradezco a mis amistades, por todo el apoyo emocional, por ayudar a levantarme todos los días, por los memes, las canciones, por acompañarme en todos los momentos, por alentarme a cumplir mis metas y por formar parte de este proyecto tan bonito.

En el camino de la búsqueda y exploración de respuestas te encuentras con académicos y profesionales que te enseñan y te inculcan valores, consejos y siembran cosas positivas en tu vida para poder afrontar las adversidades y retos que siguen, así que, a todos ellos, muchas gracias.

Se cierra un ciclo, pero inicia otro, hoy por hoy, el agradecimiento es el faro que ilumina nuestro progreso. Agradezco a todos aquellos que han sido luces en mi sendero.

Por último, solo nos resta esforzarnos por ser personas que sirvan y que dejen huella, porque la búsqueda del saber es un viaje solitario, pero el conocimiento compartido florece. Mi gratitud se extiende a quienes han compartido su sabiduría con generosidad.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A mi alma máter, la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería y al programa de posgrado MyDCI, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios y seguir creciendo en lo profesional a lo largo de 11 largos y valiosos años, primero con la licenciatura, la maestría y ahora, la culminación del doctorado.

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo brindado durante estos 4 años en el programa de Doctorado.

De igual forma, agradezco al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile por abrirme sus puertas y recibirme con todo el cariño para que se cumplieran los objetivos específicos para el cultivo celular y con el modelo de *Drosophila melanogaster*.

RESUMEN

Las enfermedades crónicas degenerativas y metabólicas, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes mellitus tipo 2 (DT2), caracterizadas por un estado constante de inflamación sistémica, tienen como principales factores de riesgo la obesidad abdominal, el sedentarismo, la mala alimentación y la resistencia a la insulina. Los flavonoides pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de las plantas que están asociados con efectos benéficos para la salud y actualmente son de importante interés en aplicaciones nutraceuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, moduladoras de enzimas y anticancerígenas, sin embargo, carecen de estabilidad y bioactividad al ser sensibles a factores como la luz, la temperatura, compuestos endógenos y cambios de pH por lo que carecen de una buena biodisponibilidad. La herramienta de la nanoencapsulación brinda mayor estabilidad y asegura la biodisponibilidad de compuestos inestables y sensibles como la quercetina. En el presente trabajo evaluamos el efecto de nanopartículas de quercetina sobre la actividad antioxidante en células Caco-2 y en un modelo *in vivo* (*Drosophila melanogaster*) el efecto sobre la expresión de marcadores de resistencia a la insulina, inflamación y antioxidantes, así como el efecto en el contenido de glucosa, triglicéridos, peso y sobrevivencia en larvas y moscas adultas. Los tratamientos se dividieron en seis grupos experimentales: dieta control (CD), CD + 0.05% de Nanoinsulina, CD + 0.05% de NanoQuercetina, dieta alta en azúcar (HSD), HSD + 0.05% de Nanoinsulina y HSD + 0.05% de NanoQuercetina. Las nanopartículas de quercetina demostraron propiedades antioxidantes al reducir la señal del biosensor redox fluorescente HyPer en células Caco-2 intactas y efectos inhibitorios en la viabilidad de células Caco-2 y Huh-7. Por otra parte, la quercetina nanoencapsulada disminuyó los niveles de glucosa circulante (glicemia) y el contenido total de triglicéridos. Además, mejoró la vida media y redujo la expresión de marcadores inflamatorios, antioxidantes y de resistencia a la insulina, tanto en larvas como en moscas adultas a las que se les indujo daño metabólico con una dieta alta en azúcar. En conclusión, las nanopartículas de quercetina mostraron un efecto antioxidante en modelo de células de cáncer de colon y también mostraron un efecto anti-inflamatorio y de reversión de un fenotipo de resistencia a la insulina en un modelo de Diabetes tipo 2 desarrollado en moscas *Drosophila melanogaster* alimentadas con dieta rica en sacarosa.

ABSTRACT

Chronic degenerative and metabolic diseases, such as cardiovascular diseases, cancer and type 2 diabetes mellitus (DT2), characterized by a constant state of systemic inflammation, have abdominal obesity, a sedentary lifestyle, poor diet and obesity as their main risk factors. Insulin resistance. Flavonoids belong to a class of secondary plant metabolites that are associated with beneficial health effects and are currently of important interest in nutraceutical, pharmaceutical, medicinal and cosmetic applications thanks to their antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, enzyme modulating and anticancer agents, however, lack stability and bioactivity as they are sensitive to factors such as light, temperature, endogenous compounds and pH changes, which is why they lack good bioavailability. The nanoencapsulation tool provides greater stability and ensures the bioavailability of unstable and sensitive compounds such as quercetin. In the present work we evaluate the effect of quercetin nanoparticles on the antioxidant activity in Caco-2 cells and in an *in vivo* model (*Drosophila melanogaster*) the effect on the expression of markers of insulin resistance, inflammation and antioxidants, as well as the effect on glucose content, triglycerides, weight and survival in larvae and adult flies. The treatments were divided into six experimental groups: control diet (CD), CD + 0.05% NanoInulin, CD + 0.05% NanoQuercetin, high sugar diet (HSD), HSD + 0.05% NanoInulin and HSD + 0.05% NanoQuercetin. Quercetin nanoparticles demonstrated antioxidant properties by reducing the signal of the fluorescent redox biosensor HyPer in intact Caco-2 cells and inhibitory effects on the viability of Caco-2 and Huh-7 cells. On the other hand, nanoencapsulated quercetin decreased circulating glucose levels (glycemia) and total triglyceride content. In addition, it improved the half-life and reduced the expression of inflammatory, antioxidant and insulin resistance markers, both in larvae and adult flies in which metabolic damage was induced with a high-sugar diet. In conclusion, quercetin nanoparticles showed an antioxidant effect in a colon cancer cell model and showed an anti-inflammatory effect and reversal of an insulin resistance phenotype in a type 2 Diabetes model developed in *Drosophila melanogaster* flies. fed a diet rich in sucrose.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 MARCO TEÓRICO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe que, las patologías cardiometabólicas son, desde hace 20 años la causa principal de mortalidad en todo el mundo, en el año 2020, el número de muertes por alguna cardiopatía fue de 2 millones, en el año 2019 aumentó hasta casi los 19 millones, además, señala que siete de las diez principales causas de muerte en el mundo son enfermedades crónicas no transmisibles, entre las que se incluyen enfermedades isquémicas del corazón, infartos, enfermedad pulmonar obstructiva, diabetes mellitus y cáncer [1]. Estas enfermedades se caracterizan por su larga duración, los periodos de remisión y recurrencia, así como por sus consecuencias discapacitantes. Sus orígenes son multifactoriales, siendo los principales factores de riesgo, la obesidad, el sobrepeso, hiperlipidemias, hiperglucemias, la inactividad física, las dietas malsanas y el consumo de sustancias como tabaco y alcohol [2].

1.2 INFLAMACIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO

Por su parte, el síndrome metabólico es un conjunto de condiciones que aumentan el riesgo de padecer enfermedades coronarias, diabetes, accidente cerebrovascular y resistencia a la insulina. Entre los factores de riesgo se encuentran: obesidad, grasa visceral, hipertensión arterial, hiperglucemia e hiperlipidemia [3]. El tratamiento de primera línea debe ser modificar el estilo de vida a través del ejercicio, dietas sanas y pérdida de peso, tratando de disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias y la proteína C reactiva [4]. Con la aparición de la obesidad y el síndrome metabólico se presentan alteraciones en la respuesta inmunitaria ya que se genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico y de bajo grado de intensidad, el cual también está presente con otras enfermedades degenerativas asociadas, tales como diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión, dislipidemias, enfermedades cardíacas. Además, el síndrome metabólico puede ser considerado una condición inflamatoria crónica de menor grado,

pero que tiene como característica una elevación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α y proteína C reactiva en sangre. La relación entre el síndrome metabólico y la inflamación es compleja, y aunque, algunos marcadores inflamatorios informan sobre el estado de salud y la predisposición de padecer alguna enfermedad crónica degenerativa, la sobrecarga metabólica, el estrés, la hipertrofia oxidativa de tejidos, la dieta rica en grasas, la genética y el ritmo circadiano provocan una reacción inflamatoria como la activación de quimiocinas, citoquinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas [5, 6].

1.3 LOS FLAVONOIDES

Una forma de prevenir la aparición de estas enfermedades crónicas no transmisibles es aumentar el consumo de alimentos ricos en compuestos bioactivos como los flavonoides, compuestos naturales que se encuentran en plantas, frutas, granos, raíces, tallos, té, vino, entre otros. Son particularmente interesantes por los múltiples beneficios que brindan a la salud gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas [7]. Sin embargo, al tratarse de moléculas que carecen de estabilidad a largo plazo, son sensibles a la luz, presentan baja solubilidad en agua y baja disponibilidad, se ha pensado en utilizar a la nanoencapsulación como estrategia prometedora que permite mejorar la biodisponibilidad y la sensibilidad. De acuerdo con las autoras Ayala-Fuentes et al., la nanotecnología ha provocado un impacto dentro de la industria alimentaria, principalmente en el desarrollo de alimentos funcionales más seguros, sanos y de alta calidad. Para mejorar las propiedades de biocompatibilidad, diseño, preparación y variación en las estructuras es importante utilizar las técnicas y tecnologías actuales para nanoencapsular flavonoides como la nanoemulsión bifásica y múltiple, el secado por aspersion, el electro-hilado y el nanoliposoma, además de la utilización de biopolímeros [8].

Los flavonoides pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de las plantas que están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y actualmente son de importante interés en aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, moduladoras de enzimas y anticancerígenas [7]. El ser humano no produce estos compuestos de forma natural, pero pueden ser adquiridos a través de la ingesta de alimentos ricos en estos, o a través de complementos alimenticios [9]. Como componente de la dieta, los flavonoides se han asociado con propiedades promotoras de la salud, algunos de estos efectos se atribuyen a su estructura, como su capacidad antioxidante y la captación y eliminación de radicales libres [10]. Otras características que se les atribuyen es la capacidad de modular proteínas y enzimas específicas, por ejemplo, xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, AMPK y fosfoinositida 3-quinasa [11].

Los flavonoides tienen una estructura de benzo- γ -pirona y se sintetizan por la ruta de los fenilpropanoides. Químicamente, su estructura posee un esqueleto de quince carbonos que consta de dos anillos de benceno unidos a través de un anillo de pirano heterocíclico [9]. En la figura 1, podemos observar el esqueleto básico de los flavonoides y su clasificación, así, se pueden subdividir en grupos según el grado de insaturación y la oxidación del anillo pirano, resultando en las flavonas, un subgrupo que contiene a la luteolina, la apigenina y la tangeritina, entre otros. También, tenemos a los flavonoles, los más estudiados de este grupo son la quercetina, el kaempferol, la miricetina y la fisetina [7].

Otro grupo de flavonoides son las flavanonas, donde encontramos a la hesperidina, la naringenina y el eriodictiol. Además, se encuentran los isoflavonoides, un subgrupo que contiene a la genisteína y la daidzeína. El grupo de las antocianinas contiene a la cianidina y a la malvidina, entre otros; por último, en el grupo de las chalconas

encontramos a la floretina, la arbutina y la chalconaringenina, entre otros [7]. La estructura fenólica, el grado de hidroxilación, sus sustituciones, conjugaciones y el grado de polimerización determinan sus actividades biológicas [9].

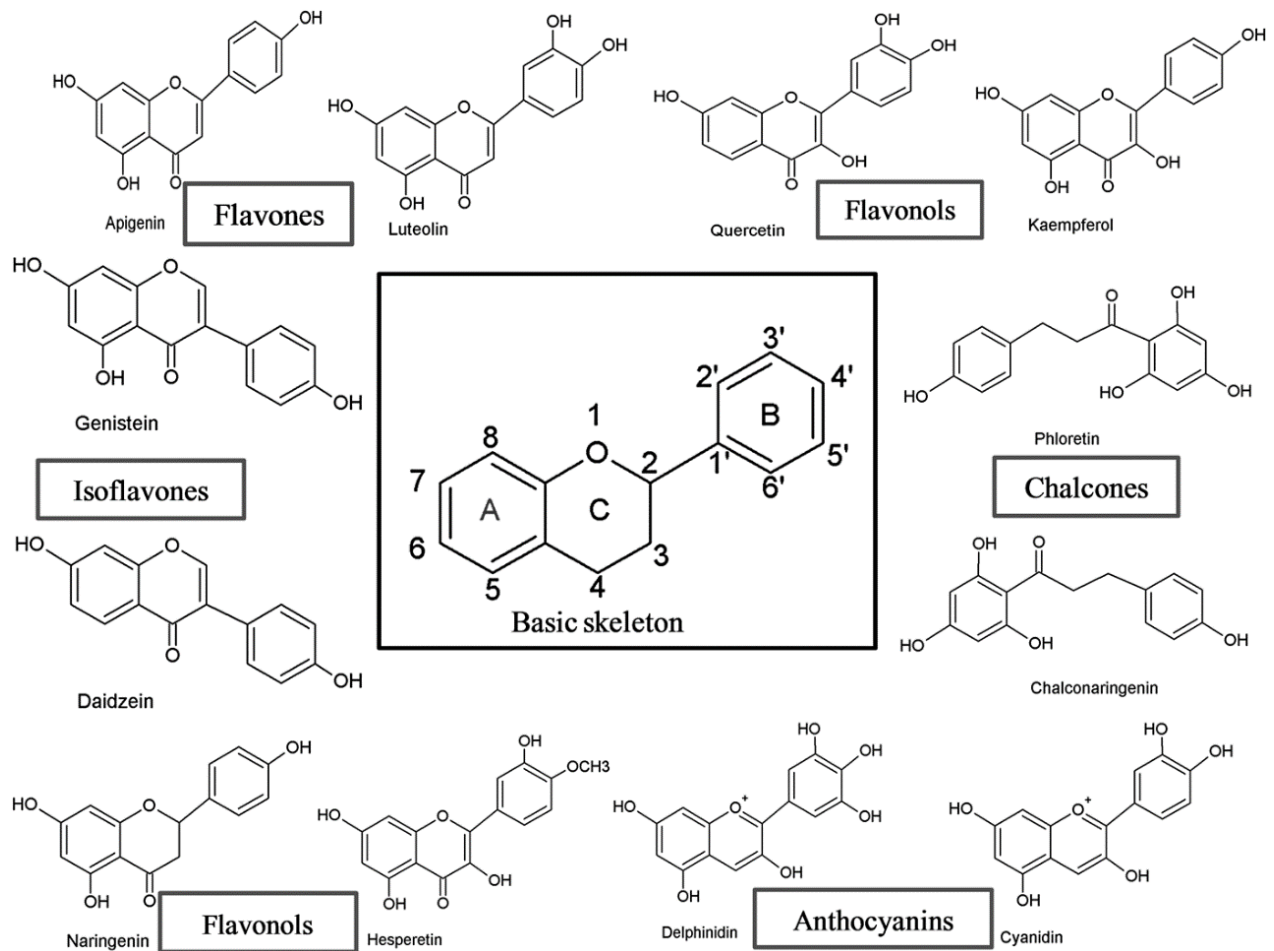


Fig. 1. Estructura básica del esqueleto de los flavonoides y sus clases. Imagen tomada de Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). *Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science*, 5, e47.

Estudios sugieren que flavonoides como el ácido elágico, la curcumina y el resveratrol muestran un potencial anticancerígeno y protector en algunos modelos de estudio como glándulas mamarias, piel, pulmones, intestino, estómago y boca [12]. Los flavonoides también actúan como oxidantes de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mejora la

función endotelial y presentan acción antiplaquetaria [13]. La quercetina, evita la formación de placas ateroscleróticas e inhibe metaloproteinasas I, lo cual explica la reducción en la mortalidad de pacientes con enfermedades coronarias e infartos [14]. La actividad proinflamatoria es otra de las propiedades estudiadas de los flavonoides y se ha sugerido que, en enfermedades como la leucemia, sepsis, asma, esclerosis, psoriasis, rinitis, colitis y artritis reumatoide; compuestos como la hesperidina, quercetina y luteolina afectan a los sistemas enzimáticos reclutando células inflamatorias para liberar especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y citoquinas proinflamatorias para eliminar patógenos extraños y reparar tejidos lesionados, además inhiben las fosfodiesterasas involucradas en la activación celular [15, 16].

1.3.1 QUERCETINA

La quercetina es un flavonoide clasificado en el subgrupo de los flavonoles y es abundante en frutas y verduras, como la cebolla, el ajo, las uvas, el brócoli y el té. Además, es el flavonoide más consumido en la dieta humana [17]. Es de color amarillo limón brillante y es completamente insoluble en agua fría, poco soluble en agua caliente, pero bastante soluble en alcohol y lípidos [18]. Químicamente es un compuesto tricíclico polihidroxlado y que en su forma aglicona, es decir, sin un azúcar adherido, actúa como antioxidante, que es su actividad biológica mayormente conocida, las formas más comunes de encontrarla son en forma de glucósido, glucurónido, sulfatada y metilada [17, 19]. Además, la quercetina tiene un efecto moderador sobre el sistema cardiovascular y ofrece respuestas antiprostanoideas y antiinflamatorias modificando la biosíntesis de eicosanoides, también tiene actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antioxidantes y psicoestimulantes, inhibe la peroxidación lipídica, la agregación plaquetaria, la permeabilidad capilar, y estimula la biogénesis mitocondrial [20, 21].

Estudios farmacocinéticos de quercetina en humanos sugieren una muy baja biodisponibilidad oral. Su absorción oscila entre el 3-17%, aunque este número varía de acuerdo con el tipo de glúcido conjugado con quercetina, la conjugación con glucósidos presenta una mayor absorción a nivel del segmento superior del intestino delgado [22]. Su distribución en tejidos periféricos indica que los metabolitos de quercetina se acumulan mayormente en el hígado y riñón del cerdo y en los pulmones de la rata [23]. El metabolismo de la quercetina ocurre en el intestino delgado y el hígado por enzimas de fase II, siendo la conjugación, la glucuronidación y la metilación las principales vías utilizadas para metabolizar a los glucósidos de quercetina. La eliminación de los metabolitos de quercetina es de forma muy lenta y es a través de la orina, heces y aire exhalado teniendo una vida media de 11 y 28 horas [24].

1.4 INULINA

La inulina es un polímero compuesto de cadenas de fructosa utilizado como carbohidratos en plantas, frutas y cereales [25]. Químicamente, es un fructano polidisperso en el que las unidades de fructosa se polimerizan por enlaces β (2—1) [26]. Este polisacárido resiste la digestión en el estómago y en el intestino delgado de los humanos y solo es fermentable en el intestino grueso, son excelentes laxantes, además, se utilizan en la preparación de alimentos como sustituto de la grasa o el azúcar, además de darles características de consistencia, textura, humedad y viscosidad, proporciona solo un 25-35% de energía en comparación con los carbohidratos digeribles [27]. Dentro de las principales propiedades nutricionales son el bajo aporte calórico, su acción como fibra dietética al resistir la hidrólisis enzimática y la estimulación en la producción de bifidobacterias [28].

1.5 NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La nanotecnología se refiere a la capacidad de controlar y reestructurar el material a nivel atómico y molecular en el rango de aproximadamente 1 a 100 nanómetros, para poder evaluar y distinguir las distintas propiedades y fenómenos a esa escala [29]. En la industria farmacéutica, la nanotecnología ha tenido un alto impacto en la fabricación de dispositivos médicos, biosensores de diagnóstico, sistemas de administración de fármacos y sondas de imágenes [30]. En el campo de la biología y la medicina, propiedades como la adaptabilidad de la superficie, la solubilidad y la capacidad de interacción permite a los investigadores responder algunas preguntas bioquímicas y genéticas más desafiantes. Por ejemplo, algunas nanopartículas que se usan para la orientación específica de células cancerosas son los dendrímeros, nanopartículas de cerámica, nanoemulsiones de perfluorocarbono y liposomas, entre otras. Hay otras que están recubiertas con anticuerpo anti-Flk que se utilizan como terapia anti-angiogénica; las nanopartículas recubiertas de oro se utilizan en las imágenes de tejidos y como terapia térmica ablativa del cáncer [31, 32].

La industria alimentaria cada día aumenta la demanda de aplicaciones de nanotecnología ya que utiliza herramientas para resolver problemas en temas de mejora del empaque, la producción, la vida útil y la biodisponibilidad. Los nanomateriales pueden ser utilizados para mejorar propiedades sensoriales como el sabor, consistencia y textura, en el transporte de nutrientes y como agentes antimicrobianos [33].

Uno de los desafíos que enfrentan los compuestos bioactivos presentes en los alimentos son la baja solubilidad y biodisponibilidad además de la poca compatibilidad con la matriz alimentaria. Para tratar de resolver esta problemática, se ha pensado utilizar la herramienta de la nanoencapsulación ya que de esta forma se liberan los compuestos bioactivos con mayor eficiencia y el tamaño de estas partículas permite su absorción en

líneas celulares específicas. Además, aumentan la vida útil y biodisponibilidad de los productos alimenticios al mejorar su biocompatibilidad [34].

Ayala-Fuentes y Col., en su artículo del 2022, plantearon que una forma de superar las limitaciones de estabilidad que tiene la quercetina en el tracto gastrointestinal es la utilización de la tecnología a nanoescala para desarrollar nanopartículas a partir de biopolímeros fermentables, como la inulina, que actúa como un sistema de liberación de quercetina en una célula diana, brindando estabilidad a la molécula. En su estudio, sintetizaron nanopartículas usando el método de secado por aspersion y evaluaron los efectos de nanopartículas no cargadas de inulina y nanopartículas cargadas con quercetina y recubiertas con el mismo biopolímero sobre la viabilidad celular con MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) en células de cáncer colorrectal humano (Caco-2), carcinoma hepatocelular (HepG2) y fibroblastos dérmicos humanos (HDFa). En su estudio encontraron que, la viabilidad de las células Caco-2 fue significativamente menor en las células tratadas con nanopartículas cargadas ($52,27 \pm 3,0$ %) en comparación con las células tratadas con quercetina libre ($108,50 \pm 2,70$ %) a $4,3 \mu\text{g/mL}$. Por su parte, las nanopartículas cargadas con quercetina disminuyeron la viabilidad celular alrededor del 30% en células HepG2 a una concentración de $4.3 \mu\text{g/mL}$ [8].

1.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

En la necesidad de buscar alternativas de calidad alimentaria biodegradables, las industrias alimentaria y farmacéutica han propuesto la utilización de nanopartículas poliméricas debido a que tienen buena compatibilidad, diseño y preparación accesibles, varían en estructuras y presentan características biomiméticas [35]. Esta membrana de polímero que recubre a las nanopartículas es fundamental en el proceso de la síntesis y

para elegir el polímero apropiado se tienen que evaluar sus características fisicoquímicas, su seguridad, toxicidad y si son o no biodegradables. Al elegirlo, existe la opción de personalizar la entrega dirigida de compuestos, con esto proporcionar una liberación prolongada o controlada, mejorar la biodisponibilidad y evitar la acción de enzimas endógenas que pudieran afectar el compuesto bioactivo [36]. Podemos encontrar dos tipos de polímeros, los naturales que se obtienen a través de proteínas y polisacáridos como el quitosano, gelatina, albúmina y alginato de sodio; y los sintéticos como el poli (ácido láctico), poli (d, l-glicólido), poli(láctido-co-glicólido), entre otros [37, 38].

1.7 NANOENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA

La elaboración de nanopartículas de quercetina apunta a dotar de mayor solubilidad en agua y otros solventes a este compuesto; esto puede mejorar la biodisponibilidad y la capacidad de absorción en células vivas [8, 22]. Además, pueden proteger a la quercetina de la degradación y oxidación, lo que aumenta su vida útil y mantiene su actividad biológica durante más tiempo. Por su parte, la quercetina al estar unida a fibra, polisacáridos o matrices vegetales por medio de enlaces covalentes, la quercetina para atravesar las membranas celulares y llegar a los tejidos o células objetivo, lo que puede aumentar su eficacia terapéutica [31]. Por último, debido a la mayor biodisponibilidad y eficacia, puede ser necesario administrar dosis más bajas de nanopartículas de quercetina para lograr los mismos efectos terapéuticos que con quercetina en su forma natural [32].

Kumari et al., elaboraron nanopartículas biodegradables a partir de poli – D – L -láctido cargadas con quercetina y al realizar las mediciones, obtuvieron tamaños en las nanopartículas de 170 ± 25 nm y la eficiencia de encapsulación de la quercetina

evaluada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) fue del 96.7% [39]. Li et al., diseñaron y caracterizaron nanopartículas lipídicas cargadas con quercetina y evaluaron su uso como vehículo de administración de compuestos activos con baja solubilidad acuosa, además, encontraron mejorías en la absorción de quercetina en el tracto gastro intestinal de ratas [40].

Varios modelos se han utilizado para evaluar y determinar los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de quercetina nanoencapsulada. Por ejemplo, Khater y Col., utilizaron un modelo de ratas a las que se les indujo colitis con sulfato de dextrano de sodio (DSS) y evaluaron la eficacia de nanopartículas cargadas con quercetina sobre la gravedad de las lesiones, estrés oxidativo y respuesta inflamatoria. Además, observaron a través del examen histopatológico e inmunohistoquímico que, la administración de nanopartículas cargadas con quercetina reducía significativamente el índice de actividad de la enfermedad. También, las nanopartículas redujeron los marcadores de estrés oxidativo, citoquinas proinflamatorias y el marcador para calprotectina fecal observados en ratas con colitis [41].

Para tratar de resolver la poca solubilidad, la baja absorción y biodisponibilidad, Sánchez-Jaramillo y Col., formularon y desarrollaron micropartículas y nanopartículas cargadas con quercetina para evaluar el efecto antifibrogénico in vivo en ratones macho, a los que se les indujo insuficiencia renal crónica con adenina y se trataron con quercetina micro y nanoencapsulada. Análisis bioquímicos, histológicos y moleculares, señalan que dosis pequeñas de nanopartículas protegen del daño renal, el mismo efecto fue observado con dosis más altas de micropartículas lo cual sugiere que la nanoencapsulación aumenta la efectividad de la quercetina, quizás porque mejora la absorción en el intestino y su concentración en la circulación sistémica y biodisponibilidad, facilitando su entrada en las células [42].

En trabajos previos de nuestro grupo dirigido por la Dra. Rocio Chavez, logramos incorporar con éxito quercetina nanoencapsulada en un pan de caja, como una forma de desarrollar un alimento funcional de uso en la población general. Este alimento fue consumido durante 3 meses por adultos que presentaban síndrome metabólico y observamos que, una dosis de 0.05% de una mezcla 1:1 de quercetina y (-)-epicatequina disminuyeron parámetros bioquímicos clínicos relacionados con obesidad, síndrome metabólico y diabetes, como glucosa, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, colesterol LDL, VLDL y HDL. Además, disminuyen la genotoxicidad celular en humanos [43].

1.8 EL MODELO DE *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (Dm), también denominada “mosca de la fruta” porque se alimenta de frutos en proceso de fermentación como plátanos, uvas, manzanas, entre otras [44]. Este organismo modelo fue introducido por Thomas H. Morgan y ha demostrado su importancia en el estudio de trastornos metabólicos que ofrece ventajas para la investigación científica ya que se puede modificar genéticamente para identificar las funciones fisiológicas, evaluar el efecto mutagénico de fármacos, compuestos bioactivos, la radiación X, gamma, nuclear y ultravioleta [45]. Este modelo ofrece ventajas gracias a que son organismos de tamaño pequeño, tienen 3 pares de cromosomas autosómicos y 1 sexual, son fáciles de cultivar en el laboratorio, tiene un tiempo de generación corto, entre 15 y 21 días. Actualmente, existe gran cantidad de líneas mutantes que producen fenotipos claros, aproximadamente el 60% de los genes involucrados en patologías humanas tienen una contraparte que se puede identificar en el genoma *Drosophila melanogaster*, por su parte, el 50% de las secuencias proteicas de la mosca de la fruta tienen análogos en los mamíferos [46, 47].

Durante más de un siglo, la investigación sobre DM ha dado como productos distintos premios Nobel y forman parte de la comprensión actual en la biología de los mamíferos. Por ejemplo, se ha descrito la radiación como agente mutagénico, la delineación de numerosas vías de señalización intracelular conservadas, incluidas Notch, Hedgehog y Wnt, la conservación de la biología del desarrollo animal, ejemplificada por los genes Hox, el descubrimiento de receptores tipo Toll como reguladores clave de la inmunidad innata, la identificación de componentes funcionales clave de las vías reguladoras del crecimiento, incluidos Ras e Hippo, la identificación genética de reguladores de la cromatina, la descripción de los mecanismos de actividad de nicho de células madre, la naturaleza molecular de la conducción neural, a través de los canales Shaker y TRP, la base molecular de los ritmos circadianos, entre otros [48].

1.8.1 MORFOLOGÍA

Los organismos adultos de DM miden de 2 a 4 milímetros de largo; generalmente son de color amarillo pálido a marrón rojizo o negro y tienen anillos negros transversales en el abdomen con ojos de color rojo o naranja. Algunas especies de *Drosophila melanogaster* tienen patrones negros distintivos en las alas, antenas plumosas y aristas erizadas en la cabeza y en el tórax. Además, tiene una de las formas más avanzadas del ojo entre los insectos contando con 760 omatidios por ojo, cada omatidio tiene una córnea y 8 células fotorreceptoras [49]. El dimorfismo sexual es característico de este modelo, ya que los machos se pueden diferenciar fácilmente de las hembras en tamaño y color. El macho es más pequeño que la hembra y la parte dorsal del cuerpo del macho es más oscura debido a una mancha negra distintiva en el abdomen. Además, en moscas recién nacidas, el dimorfismo sexual es menos notorio, entonces, para poder distinguir a la hembra del macho, la pata delantera de un macho posee un peine sexual a diferencia de la mosca hembra [50].

1.8.2 REPRODUCCIÓN Y CICLO DE VIDA

Dm es un insecto holometábolo, es decir, que se desarrolla en etapas de larva y pupa antes de la etapa adulta. La fertilización es interna y el esperma se almacena dentro del cuerpo de la hembra en un receptáculo seminal. Las hembras alcanzan la máxima producción de huevos entre el cuarto y séptimo día, durante este tiempo ponen huevos continuamente a un ritmo de 50 a 70 huevos diarios. Los huevos eclosionan en un lapso de 22 a 24 horas a 25°C. La larva que emerge es diminuta y se llama larva de primer estadio (L1), se alimenta y después de 25 horas muda a una larva de segundo estadio (L2) un poco más grande, la cual sigue alimentándose y pasadas otras 24 horas muda a la larva del tercer estadio (L3), esta es la más grande de las formas larvales, y continúa alimentándose, pero comienza a trepar por las paredes del tubo para salir de su comida, buscando un área limpia y seca para pasar al siguiente estadio, la pupa, un estadio estacionario que dura del día 5 al 9 e inicia con un color blanco amarillento, a medida que pasan las horas se vuelve más oscura, esta etapa de metamorfosis da paso a la eclosión de las pupas para llegar al estadio de imago o adulto el día 10 [51, 52].

1.8.3 Dm COMO MODELO DE DIABETES Y ENFERMEDADES DE RESISTENCIA A LA INSULINA

Para el estudio del metabolismo en Dm existen métodos para evaluar intervenciones dietéticas, mediciones de triglicéridos, colesterol, glucosa, trehalosa y glucógeno, tinciones para la detección de lípidos y el uso de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para detectar los principales metabolitos polares [53]. La mosca de la fruta tiene varias funciones metabólicas básicas similares a los mamíferos, incluida la capacidad de mantener la homeostasis de la glucosa, bajo el control de péptidos similares a la insulina (ILP) y la hormona adipocinética del péptido similar al glucagón

(AKH), y la capacidad de almacenar y movilizar reservas de energía como el glucógeno y la grasa [54].

Asimismo, se ha mencionado que el tejido adiposo en Dm produce una lipocalina denominada Neural Lazarillo (NLaz), la cual actúa como antagonista de la señalización de insulina. Se ha observado que niveles elevados de expresión génica de NLaz sirven como indicador de resistencia a la insulina en moscas expuestas a regímenes alimentarios ricos en azúcares y grasas. [55].

Además, algunos órganos y tejidos metabólicos tienen homólogos funcionalmente análogos en las moscas, como el hígado, páncreas y el tejido adiposo. Se ha demostrado que el receptor para ILP de la mosca (InR) funciona de manera similar al receptor de insulina en mamíferos en el sentido que tiene actividad de tirosina quinasa y se autofosforila en respuesta a la insulina humana, pero no a otras hormonas peptídicas [56].

En el estudio elaborado por Birse y Col., Dm ha sido expuesta a dietas altas en grasas (HFD) resultando en una disminución de DILP2 y un aumento de la glucosa total y disminución de AKT fosforilada, lo que sugiere que DM responde a HFD con una fisiología similar a la de los mamíferos [57]. Para el estudio del síndrome metabólico, se han comparado los efectos de HSD y HFD en fenotipos relacionados con parámetros como el peso, niveles de triglicéridos, glucosa circulante y sobrevida, por lo tanto, la utilización de un modelo como Dm con una disfunción metabólica permite evaluar el efecto de la quercetina nanoencapsulada en la mejora de parámetros indicadores de enfermedades metabólicas [58].

El modelo de Dm se ha convertido en una herramienta valiosa, versátil y confiable para estudios biológicos y metabólicos debido a las similitudes estructurales y funcionales, esto permite asociar procesos metabólicos en moscas con los observados en mamíferos,

además de ayudar a descifrar vías biológicas críticas para que con la investigación científica se puedan identificar posibles objetivos terapéuticos y comprender los mecanismos subyacentes a diversas enfermedades en los humanos. Alfa y Kim, en su artículo publicado en 2016, describieron que, DM es un excelente modelo para la caracterización funcional de distintos genes asociados con la diabetes mellitus tipo 2 (DT2), además, algunos mecanismos y componentes moleculares que participan en la homeostasis de la glucosa y en la resistencia a la insulina se conservan parcialmente entre moscas y humanos [59].

Lourido y Col., sugieren que, Dm es un modelo experimental fácilmente manipulable debido a la posibilidad de incorporar diferentes agentes en la dieta semisólida y la influencia determinante de factores metabólicos, facilitan la evaluación nutricional utilizando marcadores de desarrollo y fenotípicos reconocidos. En su estudio de 2021, utilizaron a Dm como modelo de DT2 generada por el consumo de una dieta alta en sacarosa y estudiaron los efectos de la inhibición de la expresión del receptor de la vía JAK/STAT Domeless, en tejido graso, sobre el metabolismo adiposo y control de la glucemia. La pérdida del receptor Domeless en las células del tejido graso revirtió tanto la hiperglucemia como el aumento en la expresión del marcador de resistencia a la insulina nLaz, que fue observado en larvas alimentadas con una dieta alta en azúcar. Este efecto fue consistente con una disminución significativa en la expresión de ARNm de Dilp2 y un aumento en el peso corporal en comparación con las moscas wild-type alimentadas con dietas altas en azúcar. Además, la pérdida del receptor Domeless redujo la acumulación de triglicéridos en las células del tejido graso de las larvas y aumentó significativamente la vida útil de las moscas adultas alimentadas con una dieta alta en azúcar [60].

De acuerdo con Musselman y Col., las moscas ofrecen una gran cantidad de paradigmas con los que estudiar la regulación y los efectos fisiológicos de la

acumulación de grasa, así, las moscas obesas acumulan triglicéridos en el cuerpo graso, un órgano que es similar al tejido adiposo de los mamíferos, que tiene la particularidad de almacenar y catabolizar lípidos. También, estas moscas en condiciones de obesidad muestran complicaciones fisiopatológicas como la hiperglucemia, menor tiempo de vida y en su función cardiovascular, similares a las observadas en humanos obesos [61].

En 2011, Musselman y Col., publicaron un artículo en el que examinaron si larvas en desarrollo expuestas a una dieta alta en calorías inducía fenotipos que eran consistentes con la resistencia a la insulina, las razones por las que usaron larvas son porque se alimentan, crecen y almacenan energía constantemente, dichos procesos están controlados por la vía de señalización de la insulina. Demostraron que una dieta alta en azúcar (HSD) indujo hiperglucemia en Dm en contraste con las moscas que se alimentaron con Dieta Control (CD). Además, las larvas consumieron menos alimento en HSD, pero desarrollaron hiperglucemia más severa, la disminución de glucógeno fue similar a la observada en mutantes de la ruta de la insulina. Los autores sugieren que, dado que el ILP homólogo de IGF-1 utiliza el mismo receptor que los ILP homólogos de la insulina, la tasa de crecimiento y el tamaño de la larva dependen de la capacidad de señalización de la insulina. De este modo, las larvas que estaban expuestas a HSD, redujeron su tamaño significativamente como consecuencia de la resistencia a la insulina. Específicamente, en dieta HSD, la tasa de desarrollo larvario resultó en un retraso significativo de 3 a 5 días en comparación con las expuestas a CD [62]. Por lo tanto, los modelos de estudios expuestos a condiciones de ingesta hipercalóricas manifiestan estados transitorios de inflamación y estrés, caracterizados por la presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, metabolitos que son productos de la actividad celular en respuestas a desafíos de estrés oxidativo.

1.9 CULTIVO CELULAR

El cultivo celular se basa en protocolos que permiten y facilitan el crecimiento de células eucariotas o procariotas en condiciones fisiológicas. Se trata de una herramienta muy versátil dentro de la investigación, gracias a que las aplicaciones son tan diversas porque permite replicar mecanismos de enfermedades o investigar metabolismo, envejecimiento, efectos y toxicidad de nuevos compuestos farmacológicos, mutagénesis y carcinogénesis gracias a su homogeneidad y la reproducibilidad en los datos que se generan [63]. El cultivo primario se refiere a la etapa del cultivo que ocurre después de aislar células de cualquier tejido y que proliferan bajo condiciones apropiadas hasta que alcanzan la confluencia. Durante esta etapa, las células deben subcultivarse ya que tienen una vida útil limitada o finita y, a medida que se siguen pasando, predominan las células con la mayor capacidad de crecer, lo que da como resultado un grado de uniformidad genotípica y fenotípica en la población [64].

El metabolismo aeróbico trae inexorablemente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son contrarrestadas por defensas antioxidantes intrínsecas que evitan los efectos nocivos intracelulares. Hernández, y Col., compararon el valor informativo de las mediciones en estado estacionario y la cinética de HyPer, un biosensor fluorescente que reporta los niveles de oxidación de proteínas y la capacidad de reducción celular después de la oxidación por el peróxido de hidrógeno. En este estudio, los autores encontraron que las tasas de recuperación de la señal HyPer después de un desafío con H_2O_2 informan el tono reductor del entorno. También, caracterizando diez líneas celulares humanas según las respuestas a los diferentes pulsos de H_2O_2 , incluida su capacidad para reducir los enlaces disulfuro evaluados en términos de su capacidad migratoria, la eficiencia de la migración celular responde a la maquinaria reductora en el citoplasma, que, a su vez, puede ser modificada por compuestos exógenos, por lo tanto, el ensayo con el biosensor HyPer permite evidenciar

el cambio en el estado transitorio y del tono oxidativo citoplasmático en células intactas desafiadas a condiciones de estrés oxidativo y comprobar si compuestos como los flavonoides u otros metabolitos son capaces de evocar un cambio en el tono redox citoplasmático [65].

1.9.1 CÉLULAS CACO-2

Son células epiteliales aisladas de tejido de colon con adenocarcinoma colorrectal. Es un huésped de transfección adecuado para estudiar citotoxicidad, ensayos de permeabilidad in vitro con diferentes productos biofarmacéuticos, en estudios de captación y absorción de hierro, en ensayos de inhibidores, transportadores, captación de fármacos formulados con liposomas, entre otros [66]. La línea celular Caco-2 al crecer en monocapas tiene una diferenciación espontánea única, transporta activamente vitaminas, hormonas, aminoácidos y azúcares, además, expresa varias enzimas, transportadores iónicos y no iónicos [67].

1.9.2 CÉLULAS HUH-7

Es un tipo de línea celular diferenciada de tipo epitelial de carcinoma de hepatocitos con múltiples mutaciones, incluida una mutación puntual en p53. Son utilizadas de forma fundamental en la investigación del virus de la hepatitis C, ya que permite la detección de candidatos a fármacos contra este virus y el desarrollo de nuevos gracias a la diferenciación y fenotipo similar a un hepatocito [68]. Además, se ha sugerido que la línea Huh-7 representa un modelo celular mayormente adecuado para evaluar la resistencia a la insulina en comparación con la línea celular HepG2, debido a que presenta biomarcadores correlacionados con la resistencia a la insulina como la

captación de la glucosa, la concentración de lípidos y glucógeno, así como la fosforilación del receptor de insulina [69].

1.10 HIPÓTESIS

Las nanopartículas de quercetina ejercerán un efecto antioxidante en células epiteliales intactas y, además, desencadenarán un efecto anti-inflamatorio en un modelo de diabetes tipo 2 (DT2) desarrollado en *Drosophila melanogaster* alimentada con dieta alta en azúcar.

1.11 JUSTIFICACIÓN

La DT2 es una de las enfermedades de rápido crecimiento en el mundo que presenta complicaciones significativas y afecta de manera sustancial la calidad de vida de quienes la padecen. Entre las complicaciones más comunes se incluyen problemas cardiovasculares, neuropatías, retinopatías y enfermedades renales, lo que subraya la importancia de un manejo integral de la enfermedad que no solo se centre en el control glucémico, sino también en la adopción de un estilo de vida saludable y medidas preventivas. La comprensión profunda de los factores de riesgo y la promoción de la conciencia sobre la prevención son elementos clave en la lucha contra esta creciente epidemia global. Se ha estimado que casi 592 millones de adultos se convertirán en pacientes diabéticos para el año 2035 debido al envejecimiento, el alto crecimiento de la población, el aumento de la urbanización, la alta prevalencia de la obesidad, el aumento del nivel de vida y la difusión de comidas rápidas ricas en calorías y grasas [70].

Actualmente, los estilos de vida malsanos que se practican en Baja California, incluidos el sedentarismo, el consumo de alcohol y tabaco, el afán por consumir comida rápida y

ultraprocesada, hacen que el estado ocupe de los primeros lugares en mortalidad a nivel nacional. De acuerdo con el reporte estadístico sobre las defunciones registradas de enero a junio de 2021 presentado por la Secretaría de Salud y el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, las cinco primeras causas de muerte en México engloban a enfermedades crónicas degenerativas, incluida la diabetes, enfermedades cerebrovasculares, lipidemias, hipertensión arterial y hepatopatías y cáncer, tanto en hombres como en mujeres [71].

Las personas que padecen enfermedades del corazón o diabetes inician terapia farmacológica con el fin de controlar su enfermedad y tener una mejor calidad de vida. Sin embargo, los fármacos prescritos tienen diferentes efectos adversos que, a largo plazo, terminan comprometiendo uno o varios órganos de los pacientes. La idea de brindar alternativas para los pacientes con diabetes e hipertensión como la implementación de alimentos con ingredientes funcionales nanoencapsulados resulta útil porque tienen menor cantidad de efectos adversos y son más seguros.

1.12 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las nanopartículas de quercetina con efecto antioxidante en células vivas y un impacto anti-inflamatorio en un modelo de DT2 en *Drosophila melanogaster* alimentada con una dieta alta en azúcar.

1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de las nanopartículas de quercetina sobre la actividad de calcio y peróxido de hidrógeno, como indicadores de actividad antioxidante en células Caco-2.
2. Evaluar el efecto de las nanopartículas de quercetina en la expresión de marcadores de resistencia a la insulina, inflamación y antioxidantes en larvas y adultos de *Drosophila melanogaster* como modelo de un organismo completo.
3. Evaluar el efecto de las nanopartículas de quercetina en el daño sistémico en términos de contenido de glucosa, triglicéridos, disminución del peso y la sobrevida en *Drosophila melanogaster* como modelo de un organismo completo.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 REACTIVOS Y SALES

Los reactivos y sales para la preparación de buffers se adquirieron de Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, EE. UU.). Los medios de cultivo y los suplementos se adquirieron de Life Technologies (Carlsbad, NY, EE. UU.). Catálogo No. 5523-10L. La ionomicina se adquirió de Tocris (Bristol, Reino Unido). El colorante Fura-2 se adquirió de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). Catálogo No. 50033-1. Las soluciones madre se prepararon en etanol absoluto a 50 mM. La solución de peróxido de hidrógeno al 30% y etanol absoluto utilizados en este trabajo fueron de Merck (Darmstadt, Alemania) Catálogo No. 1.07210.1000.

2.2 CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7); CRL-8621TM, la línea epitelial de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2); (ATCC® HTB-37TM) se adquirieron de American Type Culture Collection (Manassas, VI, USA) y se cultivaron en Medio Mínimo Esencial (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.). Las células se mantuvieron en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ / aire y el medio de cultivo se cambió cada 48 o 72 horas. Cuando se observó una confluencia entre el 70 y el 80%, las células cultivadas se expandieron a otras placas o se sembraron en cubreobjetos de vidrio (Marienfeld, Alemania) para obtener las imágenes y se utilizaron en los pasajes 20-40.

2.3 MONITOREO DE Ca²⁺ INTRACELULAR

Previamente las células Caco-2 fueron cargadas con la sonda FURA-2, el cual se une al Ca²⁺ intracelular y permite su monitoreo. Los cubreobjetos se montaron en una cámara de abierta y los medios de cultivo fueron reemplazados con tampón KRH (Krebs-

Ringer-HEPES, en mM: 140 NaCl, 4,7 KCl, 20 Hepes, 1,25 MgSO₄ y 1,25 CaCl₂, pH 7,4), suplementado con glucosa 5 mM. Las imágenes se realizaron en un microscopio Nikon Ti invertido (Tokio, Japón) equipado con objetivos de inmersión en aceite de 40x (apertura numérica, N.A. 1.3). Se acopló una lámpara de xenón al dispositivo monocromador (Cairn Research Ltd., Faversham, Reino Unido), lo que permitió una excitación dual a 340 y 380 nm. El muestreo de datos se adquirió cada 10 segundos y se expresó como una relación de 340/380. La fluorescencia de cualquier célula individual se cuantificó dibujando el mismo ROI (región de interés) en imágenes derivadas de ambos canales. Para cada registro, se realizó un lapso inicial de 20 minutos para garantizar una línea de base confiable, llamada valor de línea de base. Luego, se agregó una concentración de 1-100 μ M de las nanopartículas blanco y nanopartículas cargadas con quercetina posteriormente, dejamos correr el registro durante 15-20 minutos. Finalmente, se agregó un ionóforo (ionomicina) como control positivo (aumento de calcio).

2.4 PRODUCCIÓN E INFECCIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES

El biosensor HyPer se introdujo en el citoplasma de las células Caco-2, infectándolas con un vector adenoviral utilizando el kit AdEasy-Adenoviral Vector System (Agilent Technologies, CA, EE. UU.), mediante la adición de una dilución de virus 1: 50. Dos días después de la infección, las células estaban listas para la obtención de imágenes de HyPer, biosensor expresado homogéneamente en el citosol sin signos de citotoxicidad.

2.5 REGISTRO E IMÁGENES

Tal como se describe para las medición rasonométrica de calcio, se montaron cubreobjetos que contenían células Caco-2 que expresan HyPer en una cámara de

grabación abierta con tampón KRH suplementado con glucosa. El biosensor HyPer se excitó a 420 y 490 nm, mientras que la luz emitida se recogió con un filtro de paso largo a 520 nm. Para cada registro, se consideró un lapso inicial de 20 min para asegurar una línea de base confiable y estable, que funciona como el valor basal. Luego, se agregó una concentración de 1-100 μM de las nanopartículas blanco o nanopartículas cargadas con quercetina, y se observó su efecto durante 15-20 minutos. Se realizaron tres lavados con KRH suplementado con glucosa entre cada hito. Además, se aplicaron dos pulsos consecutivos de H_2O_2 . El primero fue de 50 μM , suficiente para evocar un aumento moderado y transitorio en la señal HyPer. El segundo fue un pulso de saturación de 500 μM H_2O_2 , útil para determinar la respuesta máxima de HyPer.

2.6 ENSAYO MTT

La determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-bromuro difeniltetrazolio) (MTT) es un ensayo colorimétrico que cuantifica el metabolismo celular a través de la reducción del tetrazolio a formazán púrpura por la acción de la enzima oxidoreductasa dependiente de NADPH. Se cuantificaron las células en cámara de Neubauer hasta obtener la densidad de 480,000-500,000 células por mililitro. Se agregaron 100 μL de ambas líneas celulares, Caco-2 y Huh-7 en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se procedió a la exposición de las células a las soluciones de quercetina, nanopartículas con quercetina y nanopartículas con inulina. Se prepararon 7 soluciones para los 3 tratamientos diferentes en medio de cultivo EMEM, sin suero bovino fetal, a las concentraciones de 1.8 nM, 3.7 nM, 7.5 nM, 15 nM, 30 nM, 60 nM y 120 nM. Posteriormente, se dejaron incubando las células por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se cambió el medio de cultivo, se enjuagó con PBS y se agregaron 10 μL del reactivo MTT y se dejaron incubando por 4 horas. Se solubilizaron

los cristales formados con 100 μ L de buffer con ácido clorhídrico y se dejó incubando toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se midió la absorbancia a 550 nm.

2.7 MODELO ANIMAL Y GRUPOS EXPERIMENTALES.

Se utilizaron moscas *Drosophila melanogaster* de la cepa silvestre Canton Special (CS, #64349) provenientes de Bloomington Drosophila Stock Center. Estos animales fueron crecidos en viales de plástico transparente en un incubador a 25°C, 50% de humedad relativa, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, desde las 8:00 hasta las 20:00 hora local. Los grupos experimentales de intervención dietaria se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos de intervención dietaria.

Grupo 1 (CD): Dieta control (grupo control)
Grupo 2 (CDN): Dieta control + 0.05% de nanopartículas con inulina
Grupo 3 (CDNQ): Dieta control + 0.05% de nanopartículas con quercetina
Grupo 4 (HSD): Dieta alta en azúcar (sacarosa [1.0 M])
Grupo 5 (HSDN): Dieta alta en azúcar + 0.05% de nanopartículas con inulina
Grupo 6 (HSDNQ): Dieta alta en azúcar + 0.05% de nanopartículas con quercetina

2.8 COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS CONTROL Y ALTA EN AZÚCAR.

El alimento estándar de las moscas, Dieta Control (CD) está compuesta en % peso/volumen por agar 1%, levadura de cerveza 8%, extracto de levadura 2%, peptona 2%, sacarosa 5.1%, sulfato de magnesio 0.05%, cloruro de calcio 0.05%, la adición de ácido propiónico como conservador y Metil p-hidroxibenzoato (Nipagin) como antimicótico y antibacteriano. Las Dietas Control suplementadas con nanopartículas blanco (CDN) y nanopartículas con quercetina (CDNQ) tienen la misma composición

que la CD más la suplementación de 0.05% de nanopartículas blanco y nanopartículas cargadas con quercetina, respectivamente.

La dieta alta en azúcar (HSD), permite inducir un modelo de DT2, en el cual las moscas desarrollan hiperglicemia, acumulación de grasas, resistencia a la insulina y otras alteraciones metabólicas [8, 9]. Esta dieta, a diferencia de la CD, tiene sacarosa en un 34.2%. Las dietas altas en azúcar suplementadas con nanopartículas blanco (HSDN) y nanopartículas con quercetina (HSDNQ) tienen la misma composición que la HSD más la suplementación de 0.05% de nanopartículas blanco y nanopartículas cargadas con quercetina, respectivamente. La composición calórica para las dietas CD y HSD se encuentran detalladas en el anexo 1 del material suplementario.

2.9 DEFINICIÓN DE LA MUESTRA

El tamaño de muestra se determinó a partir de la evidencia publicada utilizando el modelo *Drosophila melanogaster* y tomando como referencia específica los protocolos propuestos por el Laboratorio de Laura Musselman, quien desarrolló y caracterizó el modelo de diabetes inducida por dieta alta en sacarosa en estos animales [61]. De acuerdo con cada ensayo, se utilizaron grupos de moscas con un n que varía entre 10 y 50 individuos por condición y en 3 o 4 experimentos independientes para cada evaluación. Adicionalmente, algunos ensayos utilizaron réplicas técnicas para la medición.

2.10 ENSAYO DE INGESTA

Para estimar la cantidad de alimento ingerido por las moscas de los distintos grupos experimentales, se utilizó un protocolo previamente establecido [72].

El ensayo de ingesta se basa en la cuantificación de un colorante incorporado en la dieta, el cual es determinado por absorbancia en un homogenizado de moscas alimentadas con la dieta más colorante. Brevemente, las moscas se dejan en dieta con

colorante azul al 1% (Brilliant Blue, Sigma® grado alimenticio) una noche completa a modo de adaptación, teniendo 20 moscas por cada condición dietaria, a la mañana siguiente, se pasaron las moscas a su dieta correspondiente sin colorante por dos horas a fin de que eliminaran el colorante ingerido. Para realizar el ensayo, se volvieron a colocar las moscas en la dieta con colorante y comieron por 2 horas. Bajo la lupa, se revisaron y seleccionaron 8 moscas con el abdomen coloreado de azul y se les quita la cabeza para que el rojo de los ojos no interfiera en la medida colorimétrica. Las moscas seleccionadas, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL para cada grupo y por triplicado. Posteriormente, se homogenizaron en 100 µL de PBS y luego se centrifugaron durante 1 minuto a 13000 rpm, se extrajo el sobrenadante y se traspasó a una placa multipocillo para cuantificar la absorbancia a 630 nm utilizando un espectrofotómetro (TECAN Infinite f50). El homogeneizado de un grupo de moscas que no comieron alimento azul se utilizó como blanco en cada uno de los tratamientos. Finalmente, se estimó la cantidad de alimento promedio ingerida en una ventana de dos horas a partir de una curva estándar elaborada con una serie de colorante en homogeneizado de moscas en dieta control sin colorante y la ecuación previamente descrita por Laura Musselman [71].

2.11 MEDICIÓN DE PESO

Para determinar el peso, expresado en miligramos (mg), se realizó en una balanza analítica. Las moscas fueron adormecidas con dióxido de carbono (CO₂) de forma previa, después se agruparon conjuntos de 5 moscas por cada condición dietaria, se transfirieron a tubos Eppendorf de 0.2 mL previamente masados y por diferencia determinar el peso exacto en mg. El peso obtenido fue dividido en cinco, para determinar el peso promedio de una mosca. Este proceso se realizó por triplicado para cada grupo experimental. Para las larvas, se pesaron agregando una sobre otra hasta

sumar 10 y se obtuvo el peso individual por sustracción. Este procedimiento se realizó de 3 a 4 veces por condición dietaria.

2.12 MEDICIÓN DE GLICEMIA EN LARVAS L3 Y MOSCAS ADULTAS

Para cada condición dietaria, la glicemia, expresada en miligramos por decilitro (mg/dL), se determinó en larvas del tercer estadio (L3) utilizando un n=20, recogidas en cajas Petri y lavadas de 2 a 3 veces para eliminar restos del alimento y luego secadas en papel absorbente. Se realiza un corte en cruz con un cúter en el extremo inferior de un tubo Eppendorf de 0.6 mL, se tomó cada larva con una pinza-tijera y se realizó un corte en el extremo inferior del cuerpo larval y se transfirieron al tubo Eppendorf, el cual fue depositado en otro tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 4000 revoluciones por minuto (rpm) por 1 minuto a 4° centígrados, con una micropipeta se sacó una gota de hemolinfa y se diluyó 1:10 y la glucosa se evaluó mediante un glucómetro.

Para las moscas adultas, previamente adormecidas, se seleccionaron subgrupos con n=20-25 moscas y con ayuda de una aguja intramuscular se les realizó una perforación en el tórax para después ser transferidas en tubos de 0.6 mL previamente perforados en el extremo inferior, los cuales se introdujeron dentro de otros tubos de 1.5 mL con la tapa abierta. Luego se obtuvo la hemolinfa por centrifugación en frío, la cual estaba contenida en el tubo de 1.5 mL, dicha hemolinfa se diluyó 1:10 y la glucosa se evaluó mediante un glucómetro (Accu-Chek®).

La metodología para la medición de glucosa con tiras reactivas fue previamente validada en el Laboratorio de Biología Celular respecto a otro kit estándar de medición de glucosa circulante mostrando una adecuada correlación [59]. Ambos procedimientos se efectuaron en la mañana, al inicio del ciclo de luz, es decir, desde las 8:00-9:00 horas).

2.13 ENSAYO DE SOBREVIDA

Moscas de 1 a 3 días de vida se distribuyeron en grupos de 20 moscas por vial (n=300) para cada condición experimental. Cada dos días se realizó el recuento del número de moscas muertas, mientras que las vivas se traspasaron a un nuevo vial con alimento fresco de cada dieta correspondiente. El recuento se realizó hasta la muerte total de cada grupo. El registro del número de moscas vivas en el tiempo se graficó como porcentaje en una curva de sobrevivencia versus tiempo (días).

2.14 ENSAYO DE TRIGLICÉRIDOS (TAG's)

El contenido total de TAG'S se determinó utilizando el protocolo de detección colorimétrica del kit Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric de Sigma-Aldrich® (#MAK266, EE.UU.), cuyo principio se basa en que los TAG's se convierten en ácido grasos libres y glicerol, por acción de la lipasa. El glicerol liberado se oxida y emite un color fucsia, el cual es cuantificado por absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. Se utilizaron grupos de 5 moscas por triplicado de cada condición dietaria experimental en tubos de 1.5 mL en frío. Luego, se homogeneizaron en 100 μ L de PBS y el sobrenadante fue colectado en tubos nuevos. Después, se añadieron 2 μ L de lipasa a cada tubo y se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto, se adicionaron 50 μ L de una "Máster Reaction Mix", que contiene buffer de ensayo y un mix de enzimas, a cada muestra por triplicado y al blanco, que consistió en un grupo de moscas para cada dieta sin la lipasa. Las muestras se agregaron a una placa multipocillo y se incubó a temperatura ambiente por una hora. Para finalizar, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm, utilizando un espectrofotómetro (TECAN Infinite f50) y el contenido de TAG's totales fue determinado a partir de una curva estándar de glicerol que se construyó diluyendo 40 μ L del estándar de triglicéridos 1 mM con 160 μ L de buffer de triglicéridos para preparar una solución

estándar de 0.2 mM. Después, se agregaron los volúmenes seriados de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ L de la solución estándar de 0.2 mM en una placa de 96 pocillos, generando estándares de 0 (en blanco), 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo.

2.15 EXTRACCIÓN DE ARN Y EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-qPCR

Se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de los genes *Nlaz*, *Upd*, *Upd-2*, *Upd-3*, *Dilp-2*, *Dilp-3*, *Dilp-5*, *Dilp-6*, *Eiger*, *Puc*, *BMM*, *SOD-1*, *SOD-2*, *CAT* y *GPx*, utilizando un n=30 larvas o moscas según sea el caso. El tejido fue lisado en Trizol reagent (Invitrogen®) (Ambion Life Technologies, CA, EE. UU.) y luego se extrajo y purificó ARN total según las instrucciones del kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Biotek). Posteriormente, a partir de 0.5-1 μ g de ARN se realizó una retrosíntesis de ADNc utilizando M-MLV Reverse Transcriptase, Oligo(dT)₁₅ Primer y dNTP's (Deoxynucleotide Triphosphates) de Promega®. Finalmente, se llevó a cabo el RT-qPCR utilizando aproximadamente 200-400 ng de ADNc con el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, IN, EE.UU.) en reacciones con un volumen final de 10 μ L. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y se incluyeron controles negativos. Los resultados se normalizaron utilizando la expresión del gen *Rpl-19* como gen *housekeeping*. La expresión de ARNm se evaluó con el equipo y software de LightCycler® 96 System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El cálculo del cambio de expresión relativa se realizó mediante el método desarrollado por Pfaffl [73] y se expresó como veces de cambio de los niveles del transcrito de interés respecto a una condición control.

Tabla 2. Marcadores evaluados y sus homólogos en mamíferos.

Gen	Homólogo en mamíferos	Descripción	Referencia
nLaz	Apo D	Lipocalina, indicador de resistencia a la insulina	[74]
Upd	IL-1, IL-2, IL-3	Citoquina, ligando de la ruta JAK/STAT	[75]
Upd-2	IL-3, IL-6	Leptina, citoquina	[75]
Upd-3	IL-4, IL-5, IL-9	Citoquina, ligando de la ruta JAK/STAT	[75]
Dilp-2	IGF-1, IGF-2, INS	Crecimiento, ligando receptor insulínico	[76]
Dilp-3	IGF-1, IGF-2, INS	Homeostasis, ligando receptor insulínico	[76]
Dilp-5	IGF-1, IGF-2, INS	Vía de señalización de la insulina	[76]
Dilp-6	IGF-1, IGF-2, INS	Crecimiento durante la inanición	[76]
Eiger	TNF- α	Apoptosis, inflamación, defensa	[77]
Puc	DUSP10	Regulador negativo de la vía JNK	[78]
BMM	PNPLA2, PNPLA3	Metabolismo y homeostasis de glicerolípidos	[79]
SOD-1	SOD-1, SOD-3	Desintoxica por ROS y RNS, citoplasmático	[80]
SOD-2	SOD-2	Desintoxica ROS y RNS, mitocondrial	[80]
CAT	CAT	Descomposición de peróxido de hidrógeno	[81]
GPx	GTPx, GPX-4	Peroxidasa, homeostasis celular	[82]

2.16 SECUENCIAS DE PARTIDORES UTILIZADOS

Los partidores para medir expresión de los transcritos fueron previamente validados en el Laboratorio de Biología Celular y se presentan en la Tabla 2:

Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados. Nlaz, Upd, Upd-2, Upd-3, Dilp-2, Dilp-3, Dilp-5, Dilp-6, Eiger, Puc, BMM, SOD-1, SOD-2, CAT y GPx.

Gen	Secuencia Forward (3' a 5')	Secuencia Reverse (5' a 3')
Rpl-19	AGGTCGGACTGCTTAGTGACC	CGCAAGCTTATCAAGGATGG
nLaz	GGACAACCCTCGAATGTAAC	GACGGCGTATGACTCGTAATC
Upd	TCCACACGCACAACACTACAAGTTC	CCAGCGCTTTAGGGCAATC
Upd-2	AGTGCGGTGAAGCTAAAGACTTG	GCCCGTCCCAGATATGAGAA
Upd-3	TGCCCCGTCTGAATCTCACT	GTGAAGGCGCCCACGTAA
Dilp-2	CTCAATCCCCTGCAGTTTGT	CGCAGAGCCTTCATATCACA
Dilp-3	ACCCCGTGAACCTCAATCAG	GGCAGCACAATATCTCAGCA
Dilp-5	TCAATTCAATGTTGCGCCAAA	CGTGGAAAAGGAACACGATT
Dilp-6	CGATGTATTTCCCAACAGTTTCG	AAATCGGTTACGTTCTGCAAGTC
Eiger	GATGGTCTGGATTCCATTGC	TAGTCTGCGCCAACATCATC
Puc	TCCGGCGGTCTACGATATAGAAA	AGCAATAGATGCGGGAAAA
BMM	CTGCTGTCTCCTCTGCGATT	TGTAGACCCTCCAGCAGACA
SOD-1	ACACGAGCTGAGCAAGTCAA	CAGTGGCCGACATCGGAATA
SOD-2	CAGATATGTTTCGTGGCCCGT	CGGCAGATGATAGGCTCCAG
CAT	ACAACCCTTCGATGTCACC	TCTGCTCCACCTCAGCAAAG
GPx	TTCGCCAAGGTCGATGTGAA	TCGGGGCATATCGGTTGATG

2.17 TÉCNICAS ESTADÍSTICAS DE ANÁLISIS

Para determinar la significancia estadística, se utilizó el error tipo I del 5% ($p < 0.05$) y los resultados se expresan en medias y desviación estándar. Para la comparación de las medias de la glicemia, el peso, el contenido de TAG's totales y veces de cambio de los niveles de ARNm de los genes evaluados entre los grupos experimentales se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney y ANOVA de dos vías. En los ensayos donde se compararon más de dos condiciones experimentales, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba post-hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Los datos de fluorescencia y % de viabilidad celular se expresan como media \pm error estándar. Las pruebas t de Student pareadas se ejecutaron solo para comparaciones de diseños experimentales antes y después, mientras que las comparaciones de grupos múltiples o mediciones repetidas se evaluaron mediante ANOVA con análisis post hoc de Bonferroni para datos paramétricos o el método de Dunn para datos no paramétricos. Un valor de ($p < 0.05$) se consideró estadísticamente significativo.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DEL IMPACTO REDOX INTRACELULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUERCETINA EN CÉLULAS CACO-2.

Las NanoQ tienen una matriz formada por el polisacárido de tipo fructano inulina. Evaluamos si las nanopartículas no cargadas mediaban cambios en la capacidad antioxidante del citoplasma, que HyPer reporta como una disminución en su señal, previamente se transdujeron células Caco-2 con el biosensor, que posteriormente tratamos con NanoQ y nanopartículas blanco (NInu). Observamos que, las NanoQ ejercen de manera efectiva una disminución en la señal de HyPer, es decir, una disminución en la oxidación, en contraste con las NInu cuya señal de relación al biosensor se mantuvo sin cambios en comparación con su línea basal (Fig. 2A). Estos valores representados como la pendiente y que se obtienen al dividir la razón de la señal del biosensor entre el tiempo, sugieren una forma de verbalizar el efecto antioxidante (Fig. 2B.). Este exponencial expresado en segundos⁻¹, es una constante en el tiempo que representa la velocidad con la que el biosensor es reducido.

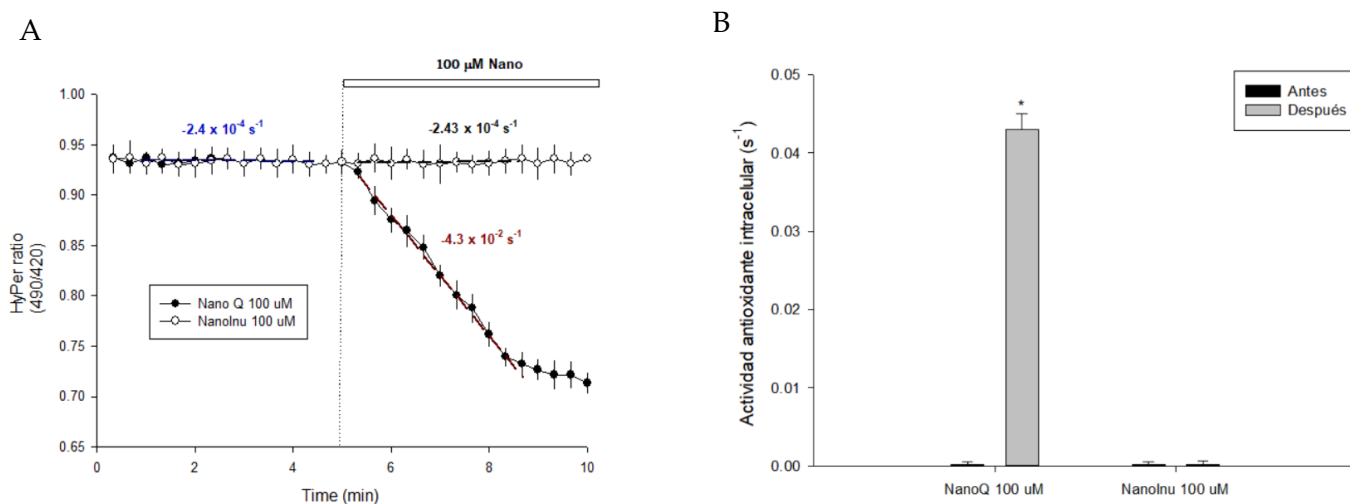


Fig. 2. A. Evolución temporal de la señal de HyPer que muestra el efecto de las nanopartículas (100 μM) en células Caco-2. NanoQ se presenta como círculos rellenos y NInu se presenta como círculos vacíos. Los datos se expresan como el promedio \pm SE de 40 células de control en tres experimentos independientes. B. Representación de las pendientes y efecto agudo de las NanoQ y NInu (100 μM) en la Actividad Antioxidante Intracelular en células Caco-2. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de Nano. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos según RM-ANOVA frente al grupo control (método de Dunn).

Evaluamos el impacto agudo de las nanopartículas de quercetina (NanoQ) en el estado redox de células Caco-2 que expresan el biosensor HyPer, el cual posee dos residuos de cisteína que solo en presencia de H₂O₂ forman un enlace disulfuro, el cual puede ser restaurado por la capacidad antioxidante del medio citosólico. Para determinar el impacto de las NanoQ expusimos a las células Caco-2 a un rango de concentraciones desde 10 nM hasta 100 µM y comparamos la pendientes de los trazos obtenidos en ausencia de nano partículas o la línea base y en presencia de las nano partículas. Con este análisis observamos que se produce una notable inflexión en la señal del biosensor al exponer las células a partir de 2.5 µM NanoQ (Figura 3).

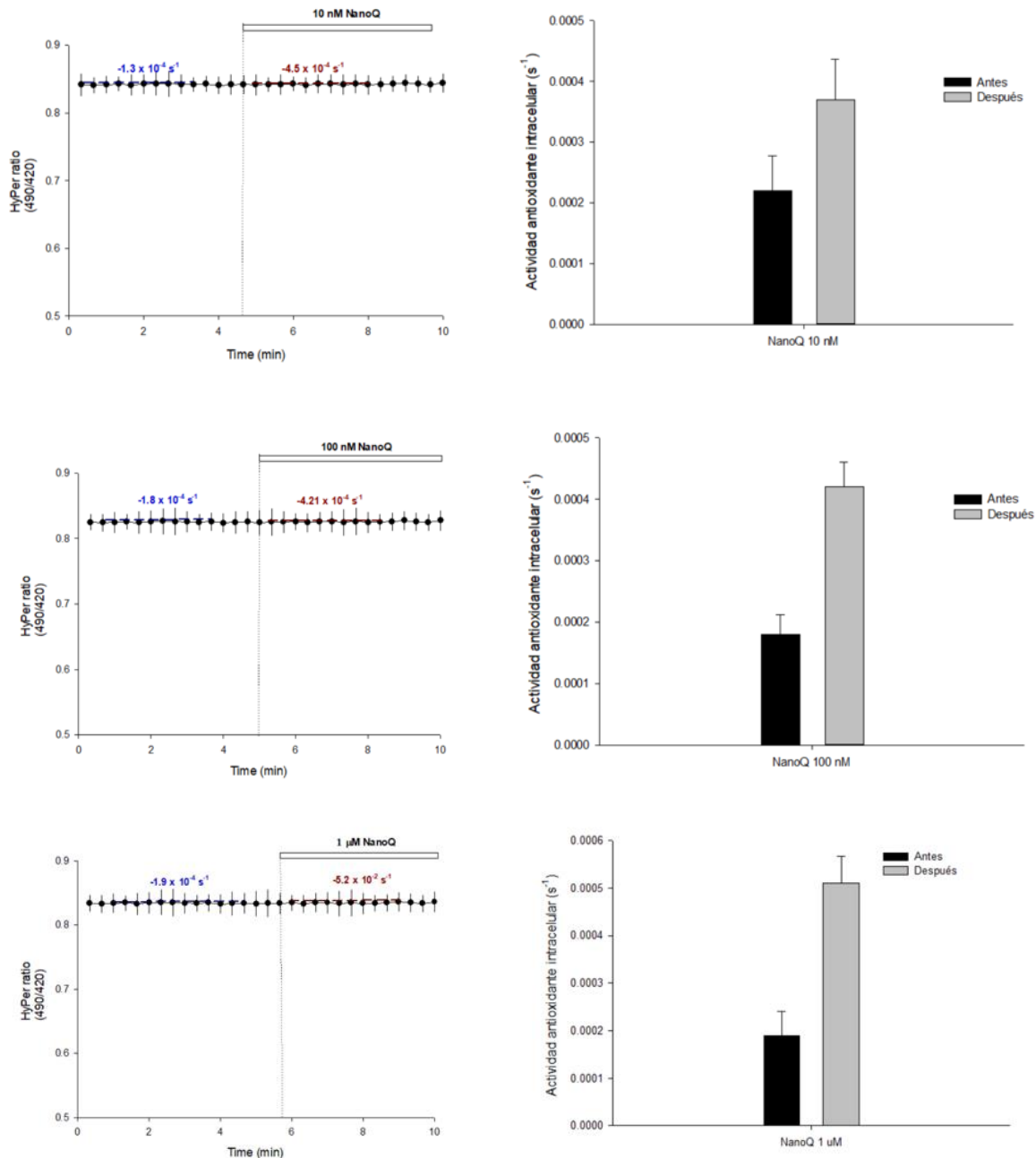


Fig. 3. Gráficas comparativas que muestran el efecto agudo de las NanoQ (10 nM, 100 nM y 1 μ M) en la señal del biosensor HyPer y en la Actividad Antioxidante Intracelular en células Caco-2. Los datos corresponden a la media \pm SE de al menos 10 células de tres experimentos independientes. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de NanoQ.

Otra concentración probada fue 2.5 μ M, suficiente para inducir una disminución significativa en la señal del biosensor en la ventana temporal (Fig. 4A). Después de agregar las NanoQ, observamos un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$), el asterisco sobre las barras indica diferencias significativas en comparación con los valores basales (ANOVA de Kruskal-Wallis, método de Dunn) (Fig. 4B).

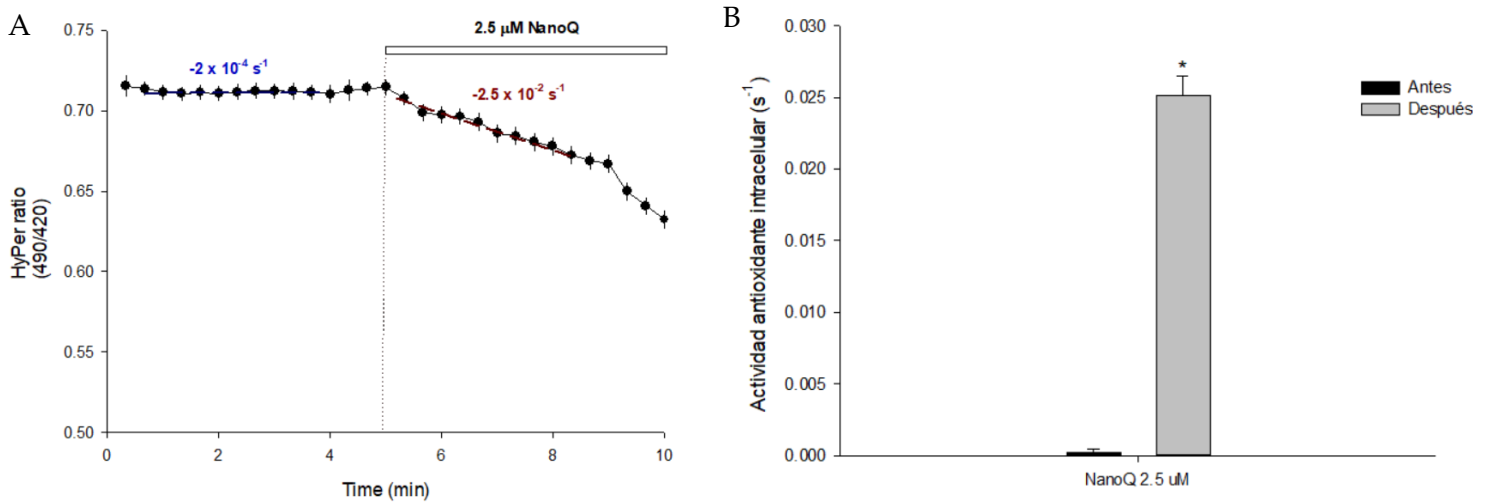


Fig. 4A. Efecto agudo de las NanoQ (2.5 μ M) en la señal del biosensor HyPer en células Caco-2. Los datos corresponden a la media \pm SE de al menos 10 células de tres experimentos independientes. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de NanoQ.

Fig. 4B. Efecto agudo de las NanoQ (2.5 μ M) en la Actividad Antioxidante Intracelular en células Caco-2. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de NanoQ. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos según RM-ANOVA frente al grupo control (método de Dunn).

A 10 μ M, observamos una disminución significativa en la señal de HyPer contrastando el estado redox basal frente a la exposición de las células con las NanoQ (Fig. 5A), por su parte la actividad antioxidante intracelular denota un aumento significativo cuando el tratamiento con las NanoQ es agregado a las células Caco-2 (Fig. 5B).

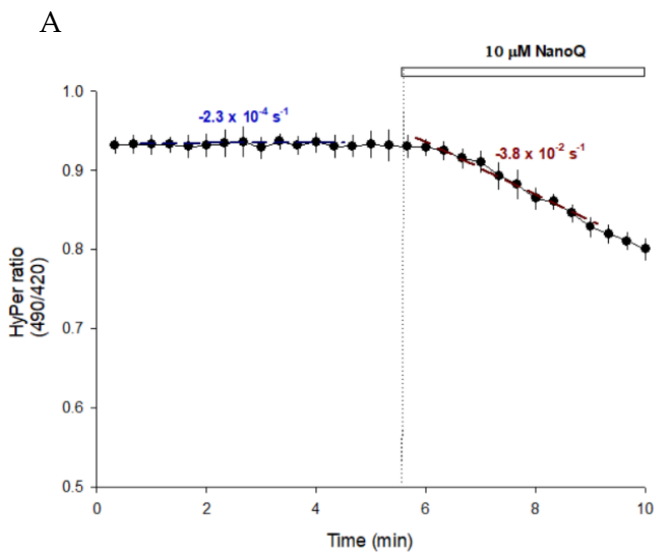


Fig. 5A. Efecto agudo de las NanoQ (10 μM) en la señal del biosensor HyPer en células Caco-2. Los datos corresponden a la media \pm SE de al menos 10 células de tres experimentos independientes. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de NanoQ.

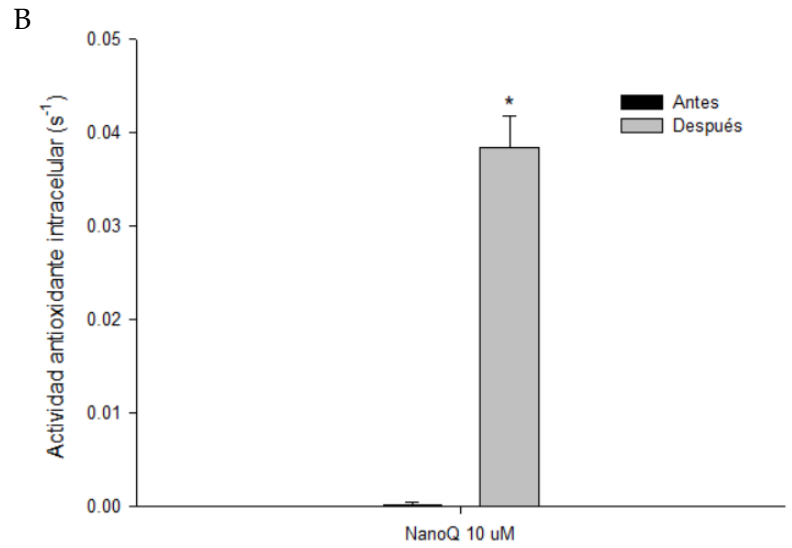


Fig. 5B. Efecto agudo de las NanoQ (10 μM) en la Actividad Antioxidante Intracelular en células Caco-2. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de NanoQ. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos según RM-ANOVA frente al grupo control (método de Dunn).

La última concentración probada fue 100 μM , la concentración máxima, donde la señal del biosensor HyPer se redujo de forma significativa al agregar el tratamiento con las NanoQ (Fig. 6A), respecto a la actividad antioxidante intracelular, observamos un aumento de la actividad post-exposición que es significativo (Fig. 6B).

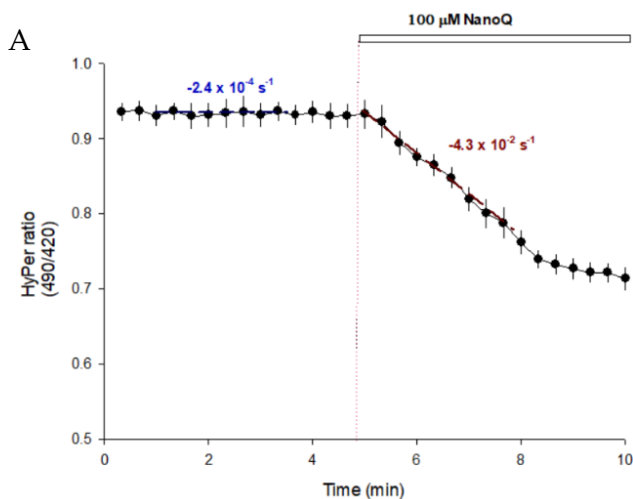


Fig. 6A. Efecto agudo de las NanoQ (100 μM) en la señal del biosensor HyPer en células Caco-2. Los datos corresponden a la media \pm SE de al menos 10 células de tres experimentos

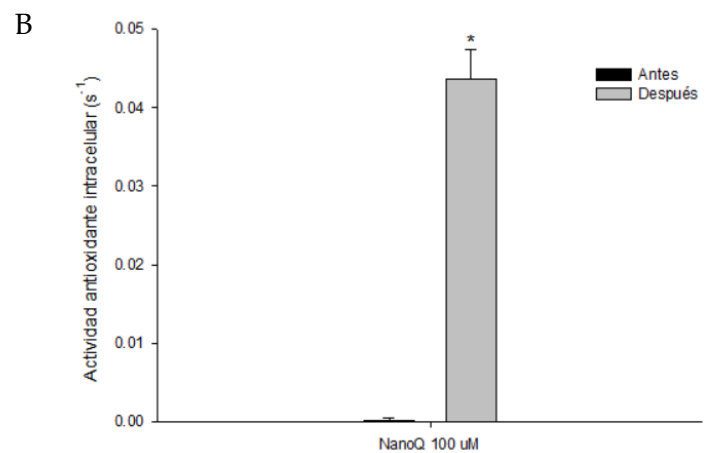


Fig. 6B. Efecto agudo de las NanoQ (100 μM) en la Actividad Antioxidante Intracelular en células Caco-2. Para cada registro de una sola célula, los valores de relación HyPer se obtuvieron antes y después de la adición de NanoQ. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos según RM-ANOVA frente al grupo control (método de Dunn).

DIFERENCIAS DEL EFECTO AGUDO Y CRÓNICO DE LAS NANOPARTÍCULAS EN CÉLULAS CACO-2.

Una vez establecido el impacto inmediato en el estado redox de células Caco-2 al agregar nanopartículas NanoQ, que interpretamos como antioxidante puesto que la señal del biosensor disminuye y considerando que la aplicación de nano partículas formadas con inulina, NInu 100 μ M, no tuvo efecto alguno, exploramos el efecto crónico o sostenido de las NanoQ exponiendo las células por 24 horas. Con este tratamiento pudimos observar que la señal basal del biosensor HyPer fue significativamente más baja que las líneas basales de las células no tratadas. La disminución de la señal basal del biosensor también fue observada en células tratadas con NInu 100 μ M, lo que sugiere que el efecto sostenido se relaciona a la presencia de quercetina, sino más bien a la inulina que contiene la nanopartícula. (Fig. 7).

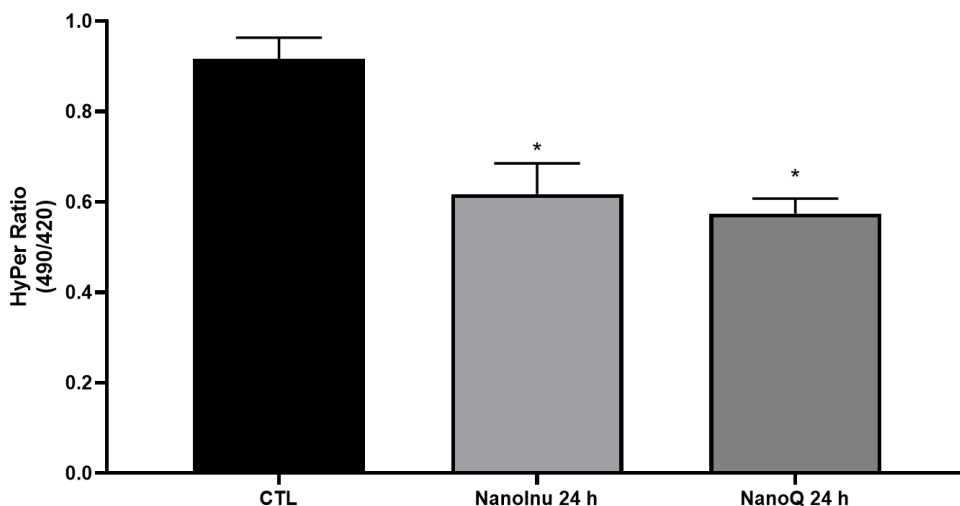


Fig. 7. Comparación de señal basal en estado redox estacionario de células Caco-2 tras ser expuestas a 100 μ M de NanoQ y NInu 24 horas después. Los datos corresponden a promedios \pm SE de 40 células de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos según RM-ANOVA frente al grupo control (método de Dunn).

TASA DE RECUPERACIÓN DEL BIOSENSOR

Otro aspecto informativo del estado redox intracelular consiste en observar la tasa de recuperación del biosensor oxidado. Esto se logra analizando la señal del biosensor durante los primeros minutos después de lavar el pulso de H_2O_2 de manera tal, que se estima la velocidad con la cual el entorno intracelular revierte o restaura el puente disulfuro, que describe la capacidad celular de reducir puentes disulfuro.

Analizamos la tasa de recuperación del biosensor HyPer de células Caco-2 expuestas de manera aguda y sostenida a las nanopartículas cargadas con quercetina y las que solo contenían la matriz de inulina. Para el caso del efecto inmediato, que implica una exposición breve a las nanopartículas de quercetina, observamos que la tasa de recuperación de HyPer más rápida en células expuestas a NanoQ 100 μM que la exhibida en células tratadas con NInu 100 μM , las cuales se comportan de manera similar a las células control (Fig. 8A). Es decir, les tomó menos tiempo a las células con este tratamiento recuperar su línea basal comparando los primeros 2 minutos post-oxidación con las células sin tratamiento. Por su parte, las células mostraron una tendencia en su tasa de recuperación similar

Siguiendo el mismo análisis en registros de células sometidas a 24 horas de exposición con NanoQ pudimos observar que existe una aceleración en la recuperación del biosensor oxidado y que este efecto no se observa en células tratadas con las NInu, al contrario, se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) en la tasa de recuperación de las células Caco-2 comparado con las células control (Fig. 8B).

Entonces, el citoplasma revierte la oxidación del biosensor y las células Caco-2 expuestas a quercetina de forma aguda y crónica, son capaces de cambiar el estado de los puentes disulfuro de manera más acelerada que las células control. Es importante señalar que el incremento máximo de la señal se produjo dentro de los 20 segundos, lo

que corresponde a la frecuencia de muestreo de las imágenes obtenidas. La eliminación del pulso de 500 μM condujo a una disminución gradual de la señal, lo que corresponde a la recuperación espontánea del biosensor.

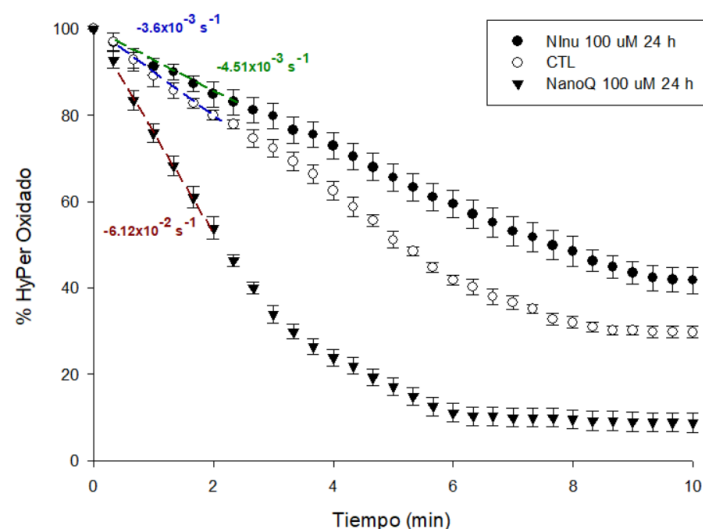
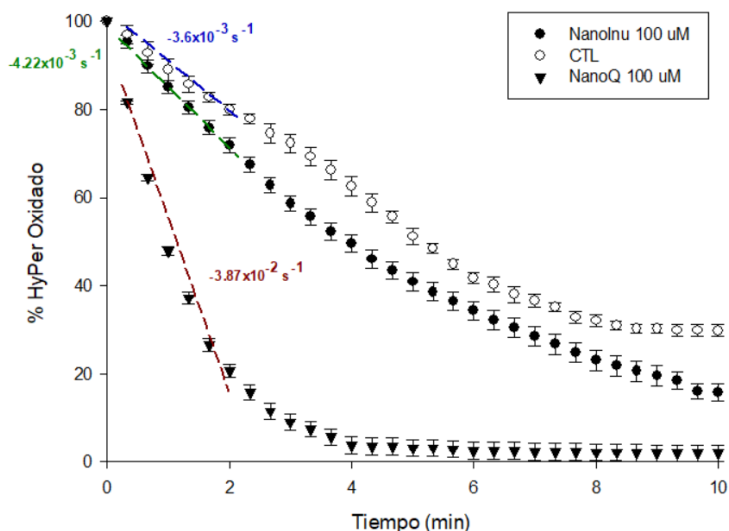


Fig. 8A. Efecto agudo en la evolución temporal de la recuperación de la señal HyPer en células Caco-2 expuestas a 100 μM de NanoQ y Ninu, inmediatamente después del lavado con el pulso de H_2O_2 500 μM . La señal máxima alcanzada por 500 μM se consideró como biosensor completamente oxidado y los datos se expresaron como porcentaje de este valor máximo. Los datos corresponden a promedios \pm SE de 37–48 células de al menos cuatro experimentos independientes.

Fig. 8B. Efecto crónico en la evolución temporal de la recuperación de la señal HyPer en células Caco-2 expuestas a 100 μM de NanoQ y Ninu, inmediatamente después del lavado con el pulso de H_2O_2 500 μM . La señal máxima alcanzada por 500 μM se consideró como biosensor completamente oxidado y los datos se expresaron como porcentaje de este valor máximo. Los datos corresponden a promedios \pm SE de 37–48 células de al menos cuatro experimentos independientes.

EFFECTO DE LA DOSIS FRENTE A LA RESPUESTA DE RECUPERACIÓN DEL BIOSENSOR HYPER

Tras registrar y evaluar la evolución temporal de la señal del biosensor HyPer, se determinó la actividad antioxidante que mostraban células Caco-2 que expresaban el biosensor tras ser expuestas a diferentes concentraciones de NanoQ.

Así, tenemos dos gráficos, el primero evidencia las concentraciones más bajas probadas, 10 nM, 100 nM y 1 μ M, que por sus magnitudes tan pequeñas podríamos pensar en un aumento de la actividad conforme aumentamos la concentración, sin embargo, estos cambios no son significativos (Fig. 9A). Sin embargo, cuando comparamos las concentraciones más altas, 2.5 μ M, 10 μ M y 100 μ M, observamos que su actividad antioxidante es significativamente más alta y es posible visualizarlo en el orden de magnitud en que crece este valor comparado con los valores observados en las concentraciones más bajas (Fig. 9B).

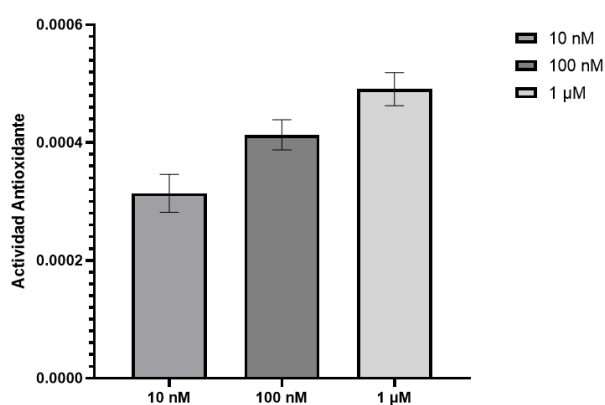


Fig. 9A. Actividad antioxidante intracelular de células Caco-2 expuestas a 10 nM, 100 nM y 1 μ M de NanoQ. Los datos corresponden a promedios \pm SE de 38 células de al menos cuatro experimentos independientes.

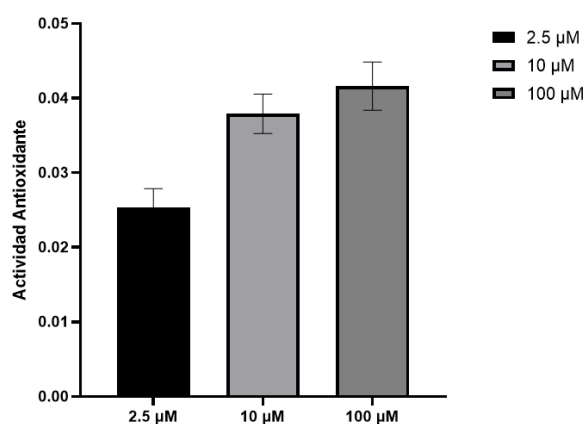


Fig. 9B. Actividad antioxidante intracelular de células Caco-2 expuestas a 2.5 μ M, 10 μ M y 100 μ M de NanoQ. Los datos corresponden a promedios \pm SE de 41 células de al menos cuatro experimentos independientes.

Las células de intestino figuran como una de las primeras barreras con la que los compuestos bioactivos interactúan, por lo que están expuestos a los efectos antioxidantes que poseen algunas moléculas químicas, como la quercetina, flavonoide que es abundante en la dieta humana. Evaluamos el efecto de la exposición aguda y crónica de nanopartículas cargadas con quercetina y otras solo con la matriz inulina en

la capacidad antioxidante del citoplasma en células Caco-2 vivas que expresan HyPer, este biosensor presenta un par de cisteínas que forman un enlace disulfuro [83].

En estado basal o estacionario, la señal del biosensor representa un equilibrio redox entre la producción endógena de H_2O_2 y la actividad de reducción de disulfuro. Nuestros resultados muestran que a bajas concentraciones, las NanoQ no provocan cambio alguno en la señal del biosensor HyPer, sin embargo, a partir de una concentración de 2.5 μM y hasta 100 μM , la señal de HyPer presenta valores más bajos que sus valores basales. Kellet, et al., reportaron que quercetina a concentraciones de 2,5 hasta 250 μM mostraron el mayor índice de actividad antioxidante, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que, la mayor actividad de inducir un estado reductor a partir de un biosensor oxidado ocurrió desde 2.5 hasta 100 μM . Aunque, estos resultados indican que el tono redox en el citoplasma de las Caco-2 alcanzan un nivel más reducido, no hemos explorado la activación metabólica de las células Caco-2 que podrían estar involucradas en el cambio global hacia un entorno citoplasmático más reductor [84].

Al comparar los efectos de quercetina e inulina en el biosensor redox, observamos que la quercetina induce una disminución más rápida y concisa de la señal de HyPer en contraste con las células control y la expuestas a nanopartículas con inulina, tanto de forma aguda como de forma crónica. Este efecto celular coincide con lo reportado con Dueñas, quien observó en quercetina, una capacidad aumentada para eliminar ROS [85]. La quercetina, a diferencia de la inulina, es un gran captador de ROS y NOS, gracias a la presencia de abundantes grupos hidroxilo en su estructura química primaria es capaz de secuestrar radicales libres y eliminar ROS. Sin embargo, el efecto antioxidante de la quercetina se genera por diferentes vías, ya que, además de su capacidad antioxidante como molécula, el compuesto es capaz de interactuar de forma funcional con los componentes celulares como aminoácidos y proteínas, aunque los

mecanismos no están del todo esclarecidos, se conocen sitios de unión a albúmina, insulina y actina [86].

Para que ocurra una reducción en la señal del biosensor HyPer, es necesaria la acción del sistema de reducción de puentes disulfuro presentes en el citoplasma, ya que la recuperación del biosensor oxidado es sensible PX-12, un inhibidor de la tiorredoxina-1 y a la incubación con auranofina , un quelante de selenio (Hernández et al., 2018), el efecto redox inducido por la quercetina podría estar mediado por la estimulación de la capacidad antioxidante de las células [65, 87].

De acuerdo con Ai, los transportadores de cassette ABC y los transportadores facilitadores de glucosa han sido reportados como mediadores de la captación de flavonoides en el epitelio intestinal; estos transportadores se expresan en células Caco-2 [88] y la eficiencia de la captación estará determinada por la afinidad por los flavonoides y abundancia de estos transportadores en la membrana [89, 90]. Según Omidian y Yousefian, en el interior de las células, los flavonoides modifican el estado redox en minutos afectando el funcionamiento de las mitocondrias, el sistema celular reductor de cisteínas o actuando como molécula neutralizante de ROS, todos ellos son mecanismos potenciales de acción para los efectos beneficiosos de los flavonoides [90, 91].

3.2 MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR

100 μ M de NanoQ y NInu no ejercen efecto en el Ca^{2+} citosólico de células Caco-2.

Evaluamos si uno de los efectos de las nanopartículas cargadas y no cargadas repercutía en los niveles de calcio intracelular. El calcio intracelular desempeña un papel crucial en la regulación de numerosos procesos celulares, y su interacción con el equilibrio redox (reducción-oxidación) es un aspecto importante de la señalización celular y la homeostasis. El Ca^{2+} es un factor que activa enzimas, regula canales iónicos y modula

proteínas relacionadas con el estrés oxidativo [82]. En este trabajo, observamos que, al cargar células Caco-2 con Fura-2, un indicador fluorescente de Ca^{2+} , y exponerlas a 100 μM de NanoQ y NInu no hubo cambios en la señal Fura-2, sugiriendo que las nanopartículas no interactúan con mecanismos de señalización intracelular que movilicen Ca^{2+} desde reservas intracelulares o permitan el influjo de Ca^{2+} extracelular. (Fig. 10).

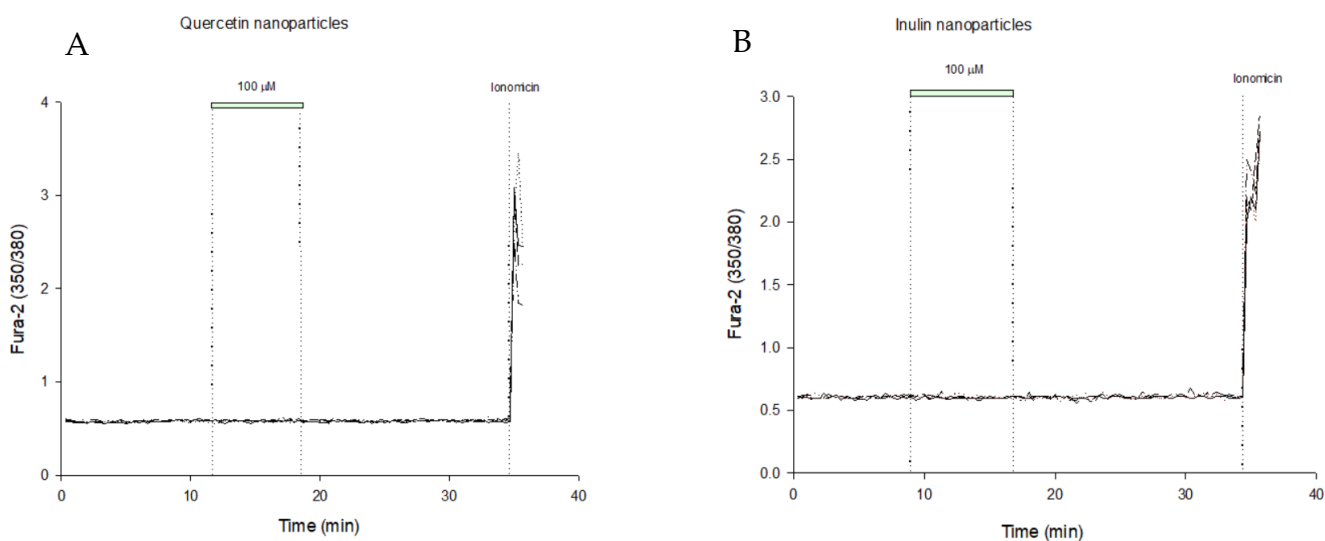


Fig. 10. Evolución temporal de la proporción de fluorescencia de Fura-2 en células Caco-2 expuestas a 100 μM de NanoQ (A) y 100 μM de NInu (B). La adición de los tratamientos aparece indicada por la línea de puntos y la barra indica su duración. Los datos corresponden a promedios \pm SE de 39 células de al menos tres experimentos independientes.

De acuerdo con Devipriya, la quercetina provoca una citotoxicidad dosis-dependiente a una concentración de 45 μM , además, se observó un agotamiento significativo de los niveles de calcio intracelular, disminuyendo las reservas intracelulares de calcio. La quercetina puede afectar la entrada de calcio a través de los canales iónicos en la membrana celular, además, puede afectar los sistemas de transporte de calcio y tiene capacidad para quelar iones como calcio y afectar la actividad de calmodulina dependiente de calcio [92].

3.3 VIABILIDAD CELULAR

Se utilizó un ensayo MTT para evaluar la viabilidad celular después de la exposición por 24 horas a quercetina, nanopartículas cargadas con quercetina y nanopartículas con inulina. Con este ensayo esperamos validar sus efectos antiproliferativos celulares. Dado que las nanopartículas se crearon específicamente para el sistema digestivo con la finalidad de abordar el cáncer de colon, era esencial examinar su capacidad para inhibir el crecimiento celular y su toxicidad no solo en un modelo de células Caco-2, sino también en células hepáticas como Huh-7, ya que, en el hígado, aproximadamente el 90% de los medicamentos que entran al cuerpo son metabolizados en este órgano.

En células Caco-2, después de ser expuestas 24 horas, el tratamiento con NanoQ dio como resultado una disminución significativa de la viabilidad celular frente a las células sin tratamiento a concentraciones mayores a los 7.5 nM hasta los 120 nM equivalentes de quercetina. La quercetina pura mostró valores de viabilidad superiores al 80% en todas las concentraciones que se ensayaron y curiosamente, las NanoQ indujeron una reducción significativa de la viabilidad celular a la concentración mayor que en este caso fue de 120 nM, comparándola con la viabilidad celular obtenida con la quercetina pura. A mayor aumento de la concentración de las NanoQ, las células Caco-2 tenían menor viabilidad celular, evidenciando una tendencia dosis-dependiente. Respecto a las nanopartículas cargadas con inulina, no observamos un efecto citotóxico relevante en la línea celular Caco-2 ya que la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80% en todas las concentraciones ensayadas (Fig. 11A).

A las 48 horas, las células Caco-2, mostraron una disminución de la viabilidad celular a la menor concentración y hasta los 15 nM, tras ser expuestas al tratamiento con NanoQ. El tratamiento con quercetina pura indujo una reducción significativa de la viabilidad celular a la concentración de 15 nM. Para el caso de las nanopartículas con inulina, no hay un cambio significativo en la viabilidad celular, al contrario, vemos un crecimiento

mayor al 100% a 48 horas a la concentración más alta y esto sugiere que la matriz de las nanopartículas no tiene un efecto citotóxico, en contraste con NanoQ (Fig. 11B).

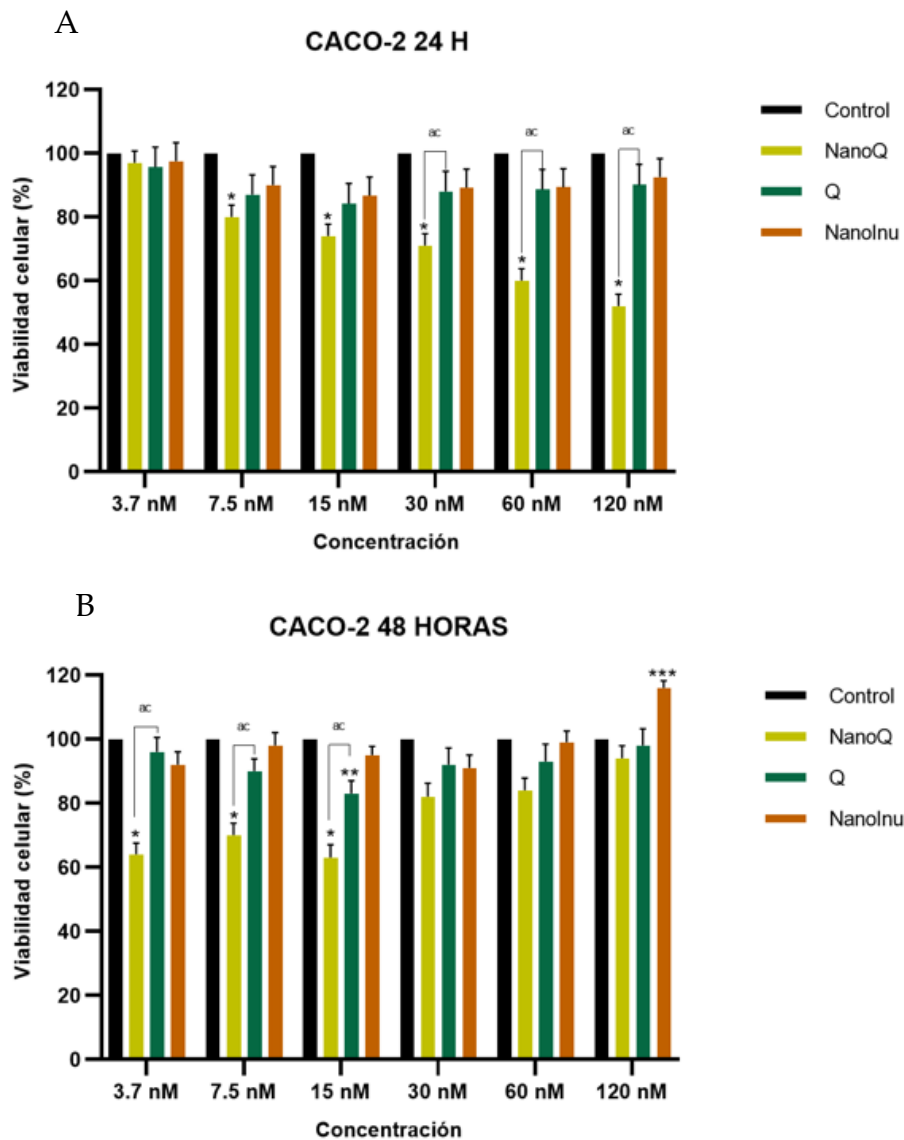


Fig. 11. Viabilidad celular en células de Caco-2 bajo tratamiento con nanopartículas cargadas con quercetina (NanoQ), nanopartículas de inulina no cargadas (NanoInu) y quercetina pura (Q) a diferentes concentraciones (3.7 a 120 nM) por (A) 24 horas y (B) 48 horas. Los valores se expresan como media \pm SD. Los controles son células no tratadas. Las diferencias significativas entre los tratamientos en las líneas celulares se determinaron con base en la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p \leq 0,05$) donde *, control frente a NanoQ, ** representa control frente a quercetina y *** representa control frente a inulina. Las diferencias significativas se determinaron con base en la distribución t de Student ($p \leq 0,05$) donde ac representa NanoQ frente a quercetina.

En Huh-7, una línea celular de hepatocarcinoma, la viabilidad celular se evaluó mediante la prueba MTT y se determinó después de 24 y 48 horas de incubación de las células con quercetina pura, NanoQ y NanoInu. Como se muestra en la Figura 12A, tras 24 horas de exposición, la quercetina pura mostró una inhibición significativa de la viabilidad celular de alrededor del 30% a 7.5 nM, en comparación con las NanoQ, que solo mostraron una inhibición del 10%. Sin embargo, a concentraciones superiores, la viabilidad celular de las Huh-7 tratadas con NanoQ disminuyó significativamente en comparación con las tratadas con quercetina pura.

A las 48 horas, las células Huh-7, mostraron una disminución de la viabilidad celular a 3.7, 15, 30 y 60 nM, tras ser expuestas a NanoQ. Los tratamientos con quercetina pura y nanopartículas con inulina no indujeron cambios significativos en la viabilidad celular, de hecho, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80%. De hecho, vemos un crecimiento mayor al 100% a 48 horas a la concentración más alta y esto sugiere que la matriz de las nanopartículas no tiene un efecto citotóxico (Fig. 12B).

En ambos tiempos de exposición, no hay efecto citotóxico con el tratamiento de las nano blanco, en todas las concentraciones probadas la viabilidad se mantuvo por encima del 85%.

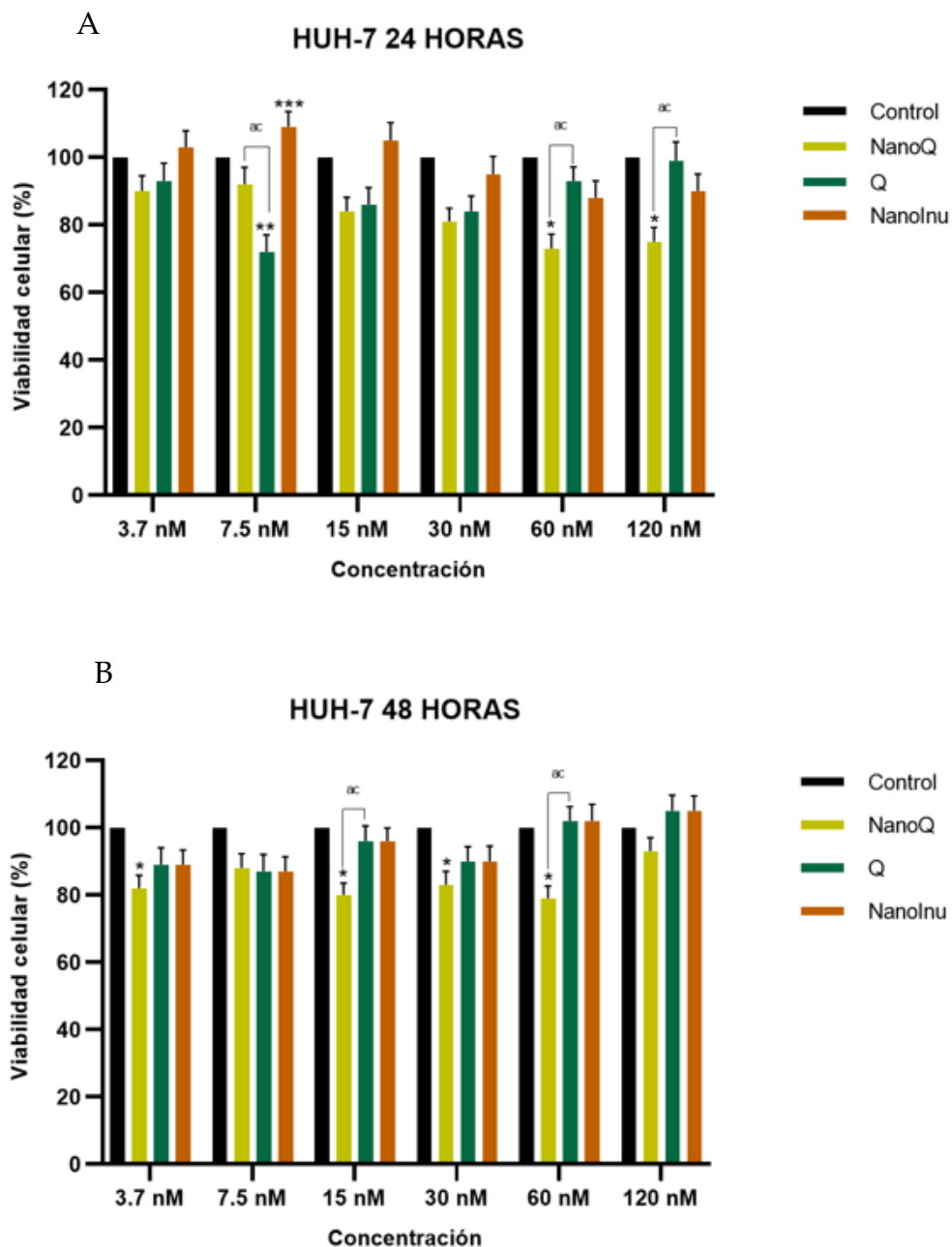


Fig. 12. Viabilidad en células Huh-7 bajo tratamiento con nanopartículas cargadas con quercetina (NanoQ), nanopartículas de inulina no cargadas (NanoInu) y quercetina pura (Q) a diferentes concentraciones (3.7 a 120 nM) por (A) 24 horas y (B) 48 horas. Los valores se expresan como media \pm SD. Los controles son células no tratadas. Las diferencias significativas entre los tratamientos en las líneas celulares se determinaron con base en la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p \leq 0,05$) donde * representa control frente a NanoQ, ** representa control frente a quercetina y *** representa control frente a inulina. Las diferencias significativas se determinaron con base en la distribución t de Student ($p \leq 0,05$) donde ac representa NanoQ frente a quercetina.

Las figuras 11A y 11B, muestran que la viabilidad de las células Caco-2 fue significativamente menor en las células tratadas con nanopartículas cargadas con quercetina ($52.66 \pm 2.85\%$) en comparación con las células tratadas con quercetina pura ($90.2 \pm 3.26\%$) a la concentración máxima de 120 nM. Por otro lado, las nanopartículas con inulina no indujeron cambios significativos en la viabilidad celular. Las NanoQ exhibieron efectos inhibitorios mayores en concentraciones superiores a los 15 nM. Los resultados observados sugieren que las NanoQ promueven la internalización de la quercetina en las células Caco-2 a través de mecanismos de endocitosis y fagocitosis, lo que desencadena una mejor actividad antiproliferativa. También, podemos afirmar que la matriz con inulina al no ejercer cambios en la viabilidad celular, las formulaciones son biocompatibles.

Las figuras 12A Y 12B nos muestran que, en células Huh-7, las nanopartículas cargadas con quercetina 30 y 60 nM, ejercen una disminución de la viabilidad celular de alrededor del 30%. Aunque, la quercetina pura a una concentración de 7.5 nM genera una mayor disminución en la viabilidad celular en contraste con el efecto de las NanoQ, en concentraciones mayores a 60 nM, las NanoQ tuvieron una mayor disminución de la viabilidad celular respecto a quercetina. El comportamiento de las nanopartículas con inulina fue similar al observado en las células Caco-2, es decir, no hubo alteración en la viabilidad celular. Un estudio realizado por Jiménez Sánchez, et al., demostró que, al analizar diferentes formulaciones de nanopartículas elaboradas a base de polisacáridos, estas no presentan citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica. Entonces, es posible sugerir que son seguros en su administración como vehículo y, debido a su versatilidad y baja toxicidad, se han utilizado como vehículo para la liberación de agentes quimioterapéuticos [93]. Li et al., demostraron que las nanopartículas que tienen como matriz un polisacárido, utilizadas para administrar quercetina, tienen actividades antiproliferativas con células Hela de manera

dependiente de la dosis y encontraron que sus NanoQ, tenían mayor efecto inhibidor que la quercetina pura lo cual coincide con nuestras observaciones [94].

3.4 ENSAYOS EN *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Glicemias

Una dieta alta en azúcar (HSD) induce daño metabólico en larvas de tercer estadio (L3) y moscas adultas de 10 y 20 días.

Tras 72 horas de exposición a las diferentes condiciones dietarias, las larvas L3 de *Drosophila melanogaster* que consumieron HSD mostraron niveles de glucosa en hemolinfa aumentados significativamente, tras ser comparadas con aquellas alimentadas con CD. Además, las larvas que se alimentaron con HSDN y HSDNQ presentaron una disminución en la glucosa en comparación con larvas alimentadas con HSD, siendo estadísticamente significativa ($p=0.05$), para la dieta suplementada con las nanopartículas cargadas con Quercetina respecto de HSD (Fig. 13).

Por otra parte, luego de diez días de exposición a las distintas condiciones dietarias, moscas adultas alimentadas con HSD presentaron un aumento significativo de la glucosa en hemolinfa en comparación con aquellas alimentadas con CD. Adicionalmente, las moscas que se alimentaron con HSDNQ presentaron una disminución de la glucosa circulante que es estadísticamente significativa ($p=0.001$) en comparación con HSD y HSDN. Por último, también se observó una tendencia ($p<0.06$) a la disminución de los niveles de glucosa en HSDNQ vs CD, sin embargo, este resultado no alcanzó significancia estadística (Fig. 14).

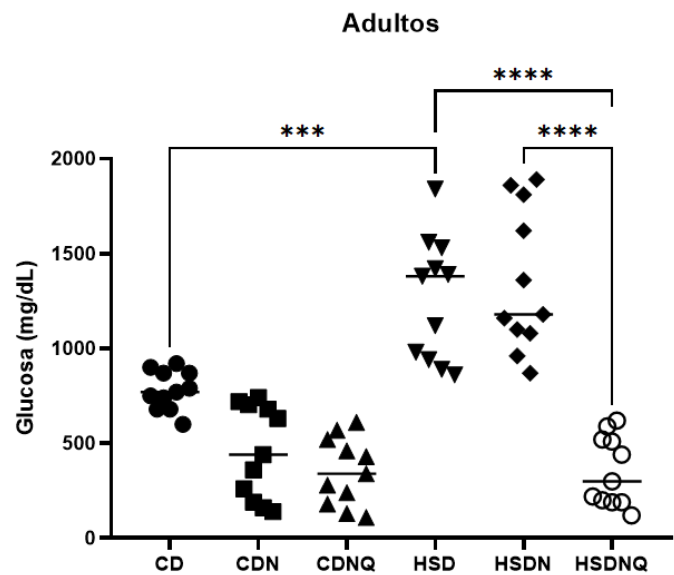
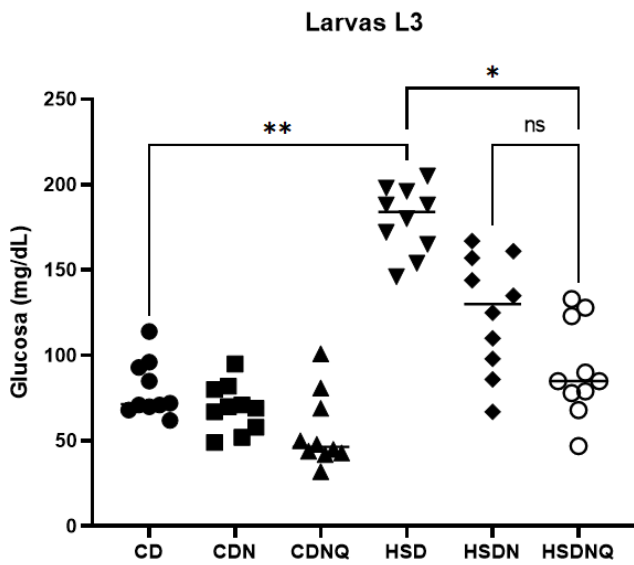


Fig. 13. Glucosa en hemolinfa. Larvas L3 de la cepa Canton S., fueron alimentadas desde L1 con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN o HSDNQ. n=45-50 animales por punto, en experimentos independientes. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. **($p < 0.01$), *($p < 0.05$) con respecto a CD.

Fig. 14. Glucosa en hemolinfa. Moscas de *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., fueron alimentadas por diez días con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN o HSDNQ. n=45-50 animales por punto, en experimentos independientes. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. ****($p < 0.0001$), ***($p < 0.001$) con respecto a CD.

En moscas adultas de *Drosophila melanogaster* alimentadas desde larvas y durante 10 días de la etapa de adulto en las diferentes condiciones dietarias, aquellas que consumieron HSD presentaron un aumento significativo de la glucosa en hemolinfa en comparación con aquellas alimentadas con CD ($p < 0.001$). Además, se observó una tendencia ($p < 0.06$) a la disminución de los niveles de glucosa circulante en moscas que consumieron CDN y CDNQ en comparación con CD. Por último, las moscas que se alimentaron con HSDNQ presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) en los niveles de glucosa en comparación con HSD y HSDN, indicando que las NanoQ revierten el efecto de HSD sobre los niveles de glucosa (Fig. 15).

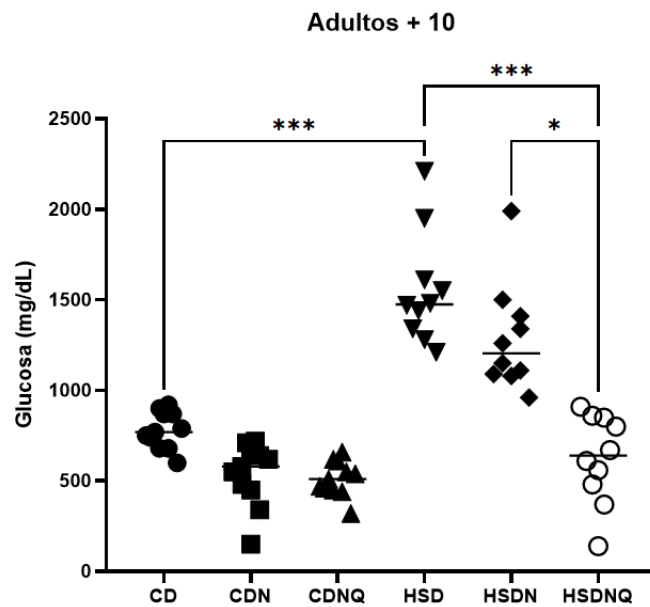


Fig. 15. Glucosa en hemolinfa. Moscas de *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., fueron alimentadas desde larvas y por diez días como adulto con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN o HSDNQ. n=45-50 animales por punto, en experimentos independientes. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. ***(p<0.001), *(p<0.05) con respecto a CD.

De acuerdo con Laura Musselman, el modelo de DM que nosotros utilizamos exhibe las características metabólicas al ser expuestas a dietas altas en calorías, como acumulación de triglicéridos, hiperglicemia y menor días de vida útil. Además, estas características, están descritas en numerosos trabajos en los cuales se buscaba establecer una condición metabólica o de obesidad para estudiar diferentes variables de interés en moscas [60, 61].

Concerniente a los resultados obtenidos en los ensayos de glicemia en hemolinfa encontramos que, a pesar de que HSD aumenta los niveles de glucemia en larvas y en moscas adultas de *Drosophila melanogaster*, comparado con CD y HSDNQ redujo significativamente los niveles de glucosa en hemolinfa en contraste con HSD.

Musselman probó que entre diferentes dietas hipercalóricas, altas en grasas, altas en proteínas y altas en azúcares, son estas últimas las que provocan efectos más severos en el desarrollo de hiperglucemia y resistencia a la insulina en larvas de tercer estadio.

Además, observaron condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia en moscas adultas [61].

Lourido utilizó la misma concentración de sacarosa en la formulación de HSD y observaron una condición de hiperglucemia en larvas respecto a CD [60]. Esto coincide con lo observado en nuestros experimentos tras comparar las formulaciones y los índices de glicemia en larvas L3 y moscas adultas de 10 y 20 días en HSD frente a CD.

En un modelo de ratas Wistar, Hemmati demostró que, la quercetina disminuye significativamente la glicemia en sangre en contraste con el grupo control [95].

Tanto en larvas como en adultos observamos un efecto hipoglucemiante relacionado con la inulina, un compuesto formado de cadenas de oligofruktosa y que tiene características de fibra dietética fermentable no digerible. Concordantemente, este hallazgo puede ser respaldado por el trabajo publicado por Liu, quien conformó una macromolécula de catequina e inulina con actividad antidiabética *in vitro* ya que fue capaz de inhibir α -glucosidasa y α -amilasa de forma *in vitro* [96]. Delzenne demostró que al alimentar ratas con una dieta rica en fibra tipo oligofruktano como inulina y oligofruktosa, estas presentan menores concentraciones séricas de TAG's y fosfolípidos, además, se ha observado que la homeostasis de glucosa e insulina es generada por la modificación de la microflora intestinal producto de la acción de inulina y otros oligosacáridos [97].

3.4.2 Ingesta

Considerando que la literatura reporta que diferentes dietas hipercalóricas pueden inducir una disminución de la ingesta de las moscas, quisimos evaluar el consumo de alimento como una forma de descartar que los resultados observados se deban a diferencias en la ingesta y no a las nanopartículas. Como se observa en la figura 16,

larvas L3 que consumieron CD, CDN y CDNQ no mostraron diferencias significativas en la cantidad de alimento ingerida en dos horas, sin embargo, aquellas que consumieron HSD, HSDN y HSDNQ mostraron una ingesta promedio significativamente menor en comparación con las dietas control durante el mismo periodo de tiempo (Fig. 16). A pesar de que la ingesta es significativamente menor en las dietas HSD, HSDN y HSDNQ contrastadas con CD, la ingesta en estas dietas no presenta cambios significativos entre sí. Adicionalmente, es importante recordar que todas las dietas ricas en azúcar tienen 64% más de densidad calórica (Kcal/ μ L de alimento), por lo que la cantidad de calorías ingeridas por las larvas L3 en HSD, HSDN y HSDNQ no difiere significativamente respecto de CD, CDN y CDNQ aun cuando la ingesta en volumen es menor (Fig. 17).

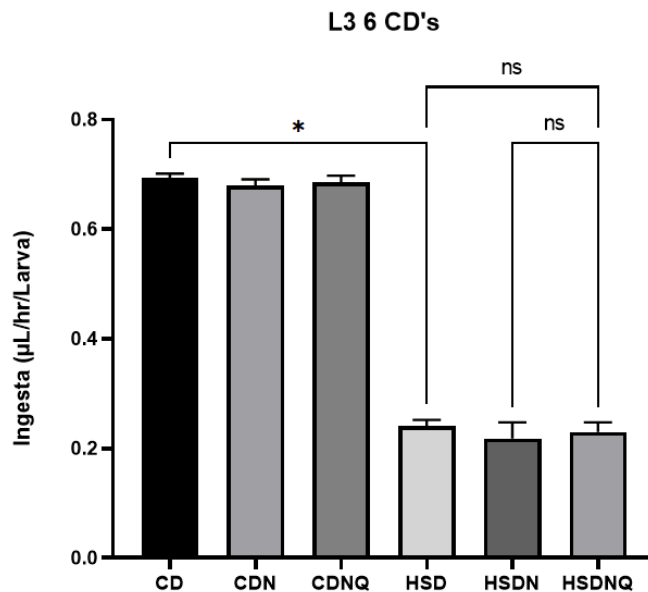


Fig. 16. Ingesta estimada de alimento. Gráfico comparativo de la ingesta en volumen/tiempo en Larvas L3 de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN y HSDNQ. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. *(p < 0.05) con respecto a CD.

Visto de otra manera, al construir una razón entre los valores de glicemia y la cantidad de alimento ingerida por larvas del tercer estadio (L3) se observa que existe un aumento estadísticamente significativo en los niveles de glucosa circulante (mg/dL) normalizado por ingesta (Vol./min) en larvas alimentadas con HSD respecto de CD (Fig. 17). Con estos resultados, podemos afirmar que el efecto hipoglucemiante está dado por el efecto del compuesto bioactivo (nanopartículas de quercetina/inulina) y no por la diferencia en la cantidad de alimento ingerida (Fig. 18).

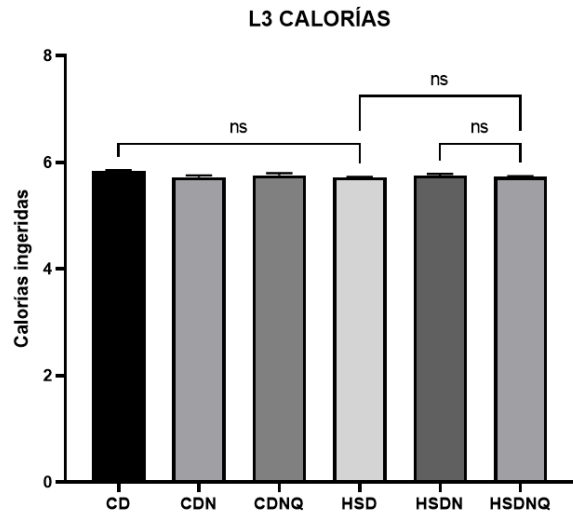
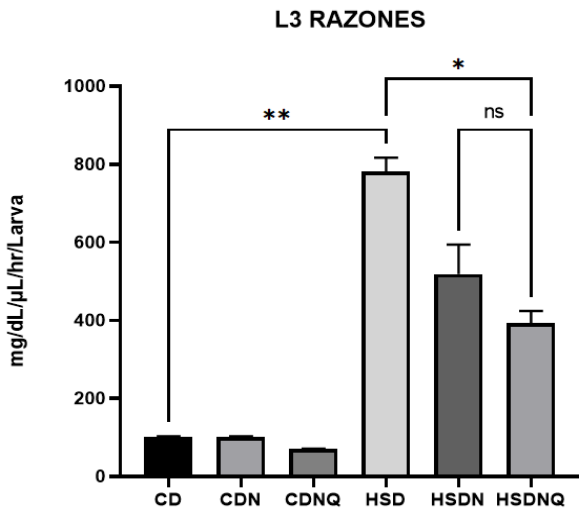


Fig. 17. Razón construida a partir de la cantidad estimada de alimento ingerida y los valores de glicemia. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. Gráfico comparativo de Larvas L3 de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN y HSDNQ. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. **($p < 0.01$), *($p < 0.05$) con respecto a CD.

Fig. 18. Calorías ingeridas por condición dietaria. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. Gráfico comparativo de Larvas L3 de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN y HSDNQ.

Moscas adultas que consumieron CD, CDN y CDNQ no mostraron diferencias significativas entre sí, en la cantidad de alimento ingerida en dos horas. Por su parte, aquellas que consumieron HSD, HSDN Y HSDNQ, aun cuando tampoco mostraron

diferencia en la ingesta entre ellas, si mostraron una ingesta promedio significativamente menor en comparación con los grupos de dietas control (Fig. 19). Del mismo modo que se comentara anteriormente para larvas, hay que recordar que a pesar de que la ingesta promedio es significativamente menor en las dietas HSD, HSDN y HSDNQ, estas dietas tienen 64% más de densidad calórica (Kcal/ μ L de alimento), por lo que, al transformar el alimento ingerido (Vol./tiempo), en calorías ingeridas, la cantidad de ingesta energética de las moscas alimentadas con dietas hipercalóricas es mayor que las alimentadas con las dietas normocalóricas (Fig. 20). Con este resultado, nuevamente podemos afirmar que el efecto hipoglucemiante está dado por el efecto del compuesto bioactivo quercetina, inulina y no por la diferencia en la cantidad de alimento ingerida (Fig. 21).

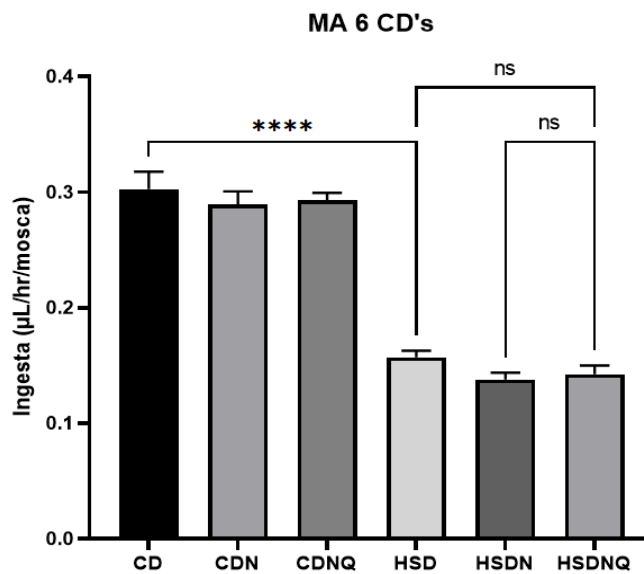


Fig. 19. Ingesta estimada de alimento. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. Gráfico comparativo de moscas adultas *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN y HSDNQ. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. ****(p < 0.0001), con respecto a CD.

Al construir una razón entre los valores de glicemia y la cantidad de alimento ingerida por moscas adultas de diez días, se demostró que en la dieta HSD las razones son

significativamente mayores en comparación con CD y evidenciamos una razón significativamente menor en las moscas alimentadas con HSDNQ al compararlas con HSD ($p=0.05$) (Fig. 20), por lo que podemos afirmar que el efecto hipoglucemiante está dado por el efecto del compuesto bioactivo quercetina, inulina y no por la diferencia en la cantidad de alimento ingerida (Fig. 21).

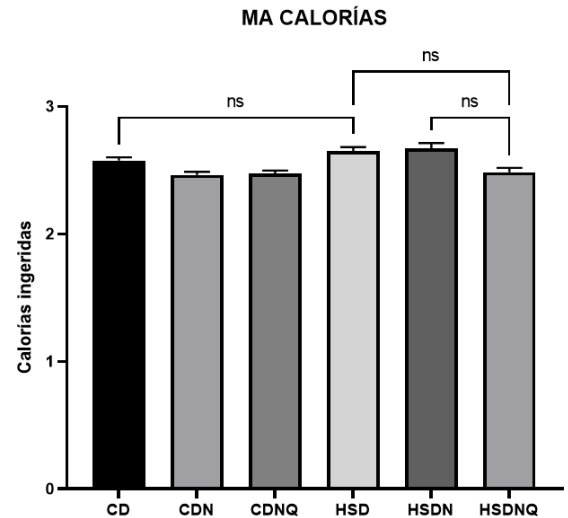
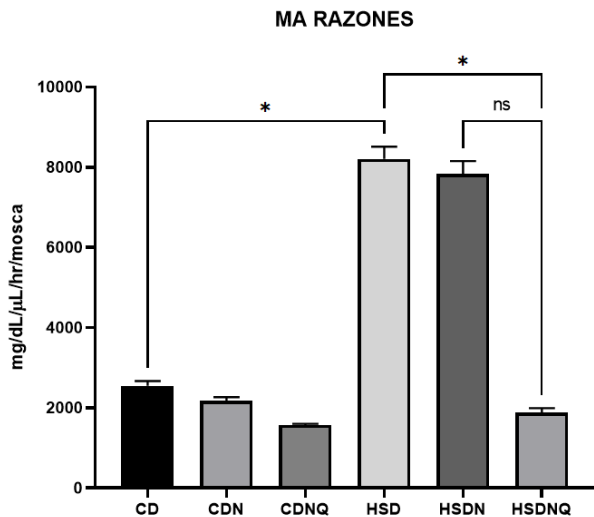


Fig. 20. Razón construida a partir de la cantidad estimada de alimento ingerida y los valores de glicemia. $n=4$ animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. Gráfico comparativo de moscas adultas *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN y HSDNQ. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p . $*(p < 0.05)$ con respecto a CD.

Fig. 21. Calorías ingeridas por condición dietaria. $n=4$ animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. Gráfico comparativo de moscas adultas *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN y HSDNQ.

No encontramos diferencias significativas en la cantidad de alimento ingerida por moscas adultas de *Drosophila melanogaster* al comparar dietas normocalóricas y, este efecto es similar en dietas hipercalóricas, sin embargo, al comparar las seis condiciones diferentes, observamos que moscas alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ ingieren

menor cantidad de alimento estimada. Esto coincide con los trabajos publicados por Musselman, quien demostró que moscas alimentadas con una dieta alta en azúcar consumen menor cantidad de alimento, sin embargo, la cantidad de calorías depende del macronutriente del que proviene, porque aun cuando parecen comer las mismas kilocalorías, las moscas adultas en una dieta rica en sacarosa desarrollan hiperglicemia [60, 61].

Respecto a la palatabilidad de los alimentos y la respuesta de saciedad por parte de moscas adultas, existen trabajos publicados por Yapici o Edgecomb acerca de que las moscas prefieren consumir sacarosa hasta la saciedad y después su tasa de alimentación se vuelve más lenta porque las calorías ingeridas en un primer tiempo son del valor nutricional necesario de acuerdo con su palatabilidad [98, 99]. Estos cambios de comportamiento también se han observado en ratones de acuerdo con Davis, quien demostró que estos modelos murinos consumen sacarosa en exceso después de encontrarse en periodos de inanición [100].

La condición HSD contiene 64% veces más calorías por peso que la dieta normal y, como consecuencia del retraso en el desarrollo, la resistencia a la insulina y la presencia del factor de crecimiento insulínico (IGF-1), las larvas alimentadas con HSD se alimentan durante un período más largo, lo que sugiere que el número total de calorías ingeridas en HSD compensa el defecto de alimentación observado.

3.4.3 Peso

Al evaluar del peso de larvas del tercer estadio (L3) que fueron alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ se observó una disminución significativa en la masa respecto a las larvas de los grupos CD, CDN y CDNQ. En promedio, las larvas alimentadas con HSD,

HSDN y HSDNQ presentaron una reducción del 52.2% en el peso respecto a las alimentadas con CD, CDN y CDNQ (Fig. 22).

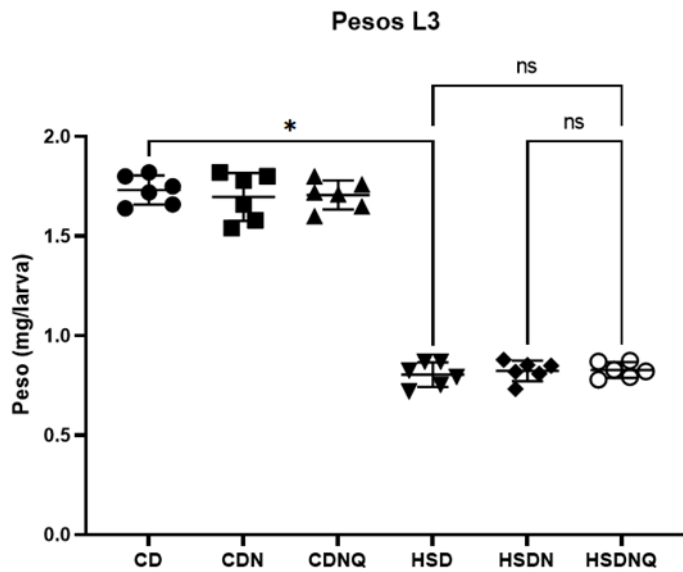


Fig. 22. Masa promedio de las larvas, n=5 animales por punto y cada punto corresponde a la masa promedio de 5 larvas, con 3 réplicas técnicas en 3-4 experimentos independientes por grupo. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni *(p < 0.05).

Moscas adultas de *Drosophila melanogaster* alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ mostraron una masa significativamente menor respecto a las moscas de los grupos CD, CDN y CDNQ. En promedio, las moscas alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ mostraron una reducción del 21.8% en su peso respecto a las alimentadas con CD, CDN y CDNQ (Fig. 23).

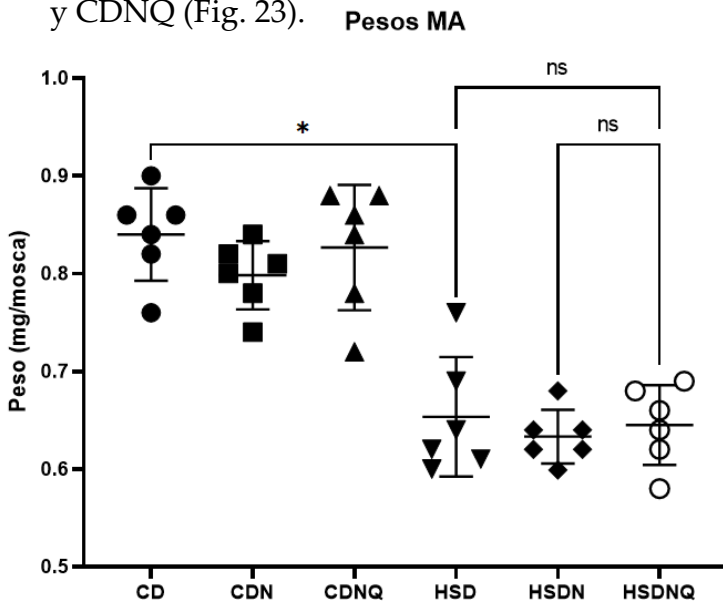


Fig. 23. Masa promedio de las moscas, n=5 animales por punto y cada punto corresponde a la masa promedio de 5 moscas, con 3 réplicas técnicas en 3-4 experimentos independientes por grupo. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. *(p < 0.05) con respecto a CD.

Distintos autores han reportado efectos de dietas hipercalóricas sobre el peso [101, 59, 61]. Por ejemplo, Baenas y Col., observó que el peso de las moscas adultas alimentadas con HSD (se redujo en un 20%) en relación con CD. Esto coincide con nuestros resultados observados en moscas adultas ya que las dietas hipercalóricas disminuyeron el peso en un 21.8% respecto a las dietas normocalóricas [102]. La resistencia a la insulina en moscas adultas viene acompañada de una condición de retardo en el crecimiento (menor peso), hiperglucemia e hiperlipidemia, este hallazgo coincide con el trabajo de Musselman, quien demostró que, aunque se pueden formular dietas altas en azúcares con sacarosa, glucosa o fructosa, estas modifican la fisiología de las larvas y de moscas adultas resultando en una disminución de hasta un 25% en peso tras la exposición [60, 61].

Baenas y Col., reportó que, la ganancia de peso no parece ser el parámetro más apropiado para definir la obesidad en las moscas, ya que, el retardo en el crecimiento influencia el peso de forma negativa. Sin embargo, hay características más específicas para definir un fenotipo asociado con obesidad, como la acumulación de triglicéridos, la hiperglicemia y las fallas en la señalización de la insulina. Concerniente a esto, encontraron también que, moscas hembra alimentadas con HSD pesaban menos en contraste con CD tras 20 días de exposición. En machos no observaron mayor diferencia [102].

En larvas de tercer estadio encontramos un efecto similar, ya que las larvas alimentadas con CD tienen mayor peso en contraste con las alimentadas con HSD. Esto coincide con el trabajo publicado con Lourido, ya que encontraron que las larvas tienen menor pesaje cuando consumen una dieta alta en azúcar [60]. De igual forma, Musselman demostró que larvas de tercer estadio en HSD tienen menor peso respecto a CD. Sin embargo, la cantidad de calorías ingeridas en las seis condiciones dietarias diferentes no mostraron diferencias significativas entre ellas [61].

3.4.4 Sobrevida

Los trastornos fisiológicos que derivan del consumo de dietas hipercalóricas promueven el desarrollo de enfermedades crónicas que determinan directamente el tiempo de vida útil. Así como en otros modelos, en moscas, la dieta alta azúcar reduce significativamente la vida media de los adultos [103]. Como una manera de explorar si las nanopartículas de quercetina pueden modular el efecto de la HSD, evaluamos el impacto de las seis diferentes dietas hipercalóricas en la sobrevida de las moscas. Como se observa en la figura 23, las moscas alimentadas con CDNQ aumentaron en 10.53% la vida media respecto de las moscas alimentadas con CD. Por otra parte, HSD y HSDN disminuyeron en un 33.3% y 36.84% respectivamente la vida media de las moscas respecto de CD. Y, para HSDNQ, la vida media disminuyó solo en un 17.5% respecto a CD, lo que representa 15.8% más respecto de HSD. Esta mejoría se tradujo en que, en promedio, las moscas alimentadas con esta dieta alta en sacarosa suplementada con quercetina nanoencapsulada (HSDNQ) vivieron 9 días más en el 50% de muerte que las alimentadas con HSD (Fig. 24).

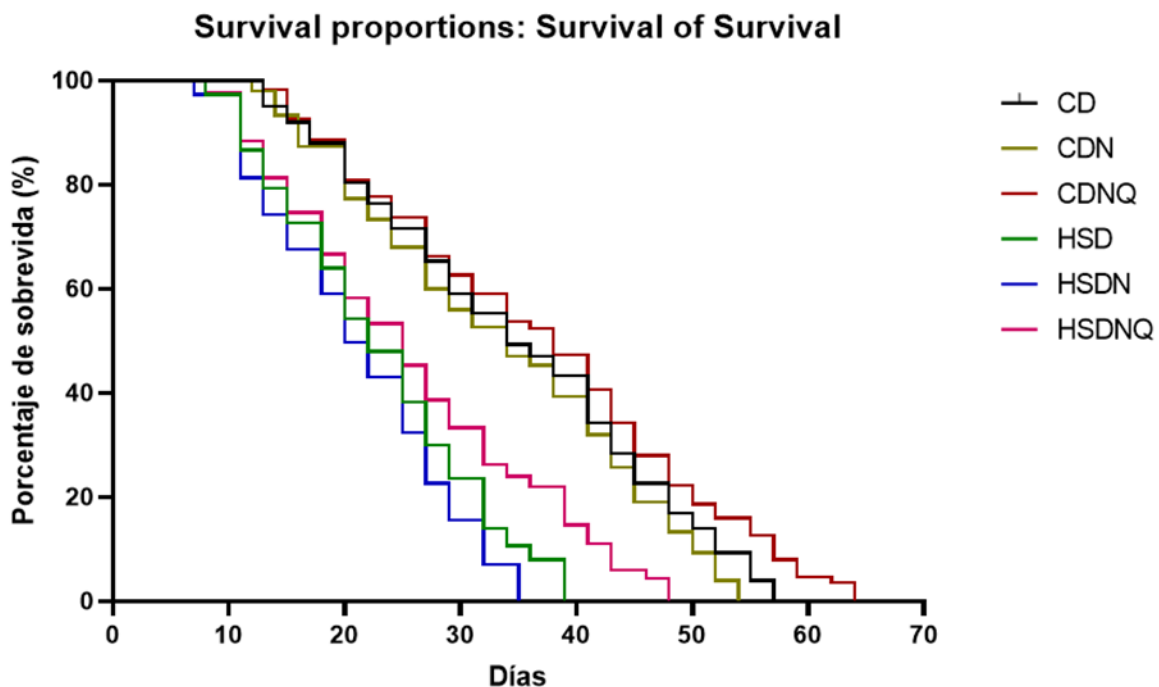


Fig. 24. Curva de sobrevida de moscas *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN o HSDNQ hasta su muerte. n=300 animales por grupo.

Baenas encontró que, en dietas hipercalóricas, las moscas tienen menor supervivencia hasta el día 30, lo cual coincide en parte con nuestros resultados, aunque la vida media de HSDNQ se extendió hasta el día 48 [102]. Sin embargo, en el trabajo publicado por Lourido, la vida media de moscas adultas se extendió hasta casi 60 días en CD y 40 días para HSD [60]. Skorupa encontró que la vida media para moscas adultas alimentadas con HSD es en promedio de 40 días en contraste con CD [101].

Jianbo Na encontró resultados similares al determinar una sobrevivencia de 50 días para una HSD y hasta 70 días para CD [104]. El resultado que esperábamos era que, los fenotipos de obesidad y resistencia a la insulina que desarrollan las moscas adultas alimentadas con HSD afectaran su vida media, sin embargo, las moscas expuestas a HSDNQ aumentaron su vida útil en comparación con HSD y, CDNQ mejoró la vida útil en contraste con CD. Este efecto de mejora en la vida útil de las moscas adultas expuestas a HSDNQ y CDNQ respecto a HSD y CD, podría ser explicado por la reversión de otros parámetros como la disminución de la glicemia y el contenido de TAG's, esto se relaciona con una mejor condición de los fenotipos asociados a resistencia a la insulina y al modelo de obesidad.

Dake Zhang observó que, una solución de quercetina 0.05 M prolonga la vida media de moscas bajo una intensidad de luz azul de 3000 lux, 50% en hembras y 66.7% en machos [105]. Kong observó el potencial de quercetina para mejorar la vida útil en moscas a las que se les indujo Alzheimer y destacó que quercetina mejora la vida media de moscas adultas [106]. Proshkina demostró que la quercetina 1 uM como suplemento en una CD mejora la vida útil de las moscas en contraste con CD [107]. Esto coincide con nuestros resultados porque observamos que la adición de quercetina a las formulaciones control y rica en azúcar mejora la vida útil de las moscas adultas aumentando los días que estas sobreviven frente a CD y HSD respectivamente.

3.4.5 Contenido Total de Triglicéridos (TAG's)

Tras 72 horas de exposición a las diferentes condiciones dietarias, larvas L3 de *Drosophila melanogaster* alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ presentaron niveles de TAG's totales significativamente mayores, en comparación con aquellas alimentadas con CD, CDN y CDNQ ($p=0.0001$). Las larvas L3 alimentadas con HSDNQ presentaron una disminución significativa (19.15%) en la concentración de TAG's totales comparada con las dietas hipercalóricas HSD y HSDNQ. Por su parte, entre las dietas controles, no hubo diferencia significativa Fig. 25).

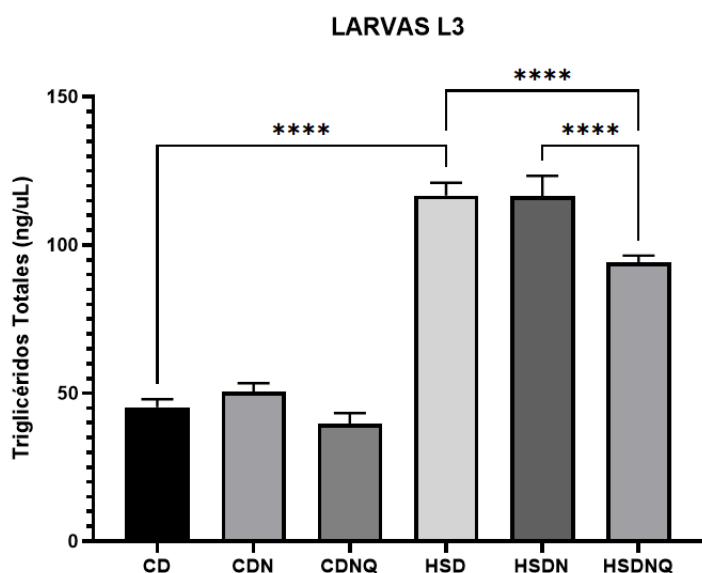


Fig. 25. TAG's totales n=5 animales por punto y 2 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes. Larvas L3 de la cepa Canton S., fueron alimentadas con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN o HSDNQ. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ****($p < 0.0001$).

Del mismo modo, a los diez días de exposición a las diferentes condiciones dietarias, moscas adultas alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ presentaron niveles de TAG's totales significativamente mayores, en comparación con aquellas alimentadas con CD, CDN y CDNQ ($p=0.01$). Se observa una disminución significativa en la concentración de TAG's totales en las moscas alimentadas con HSDNQ respecto a las otras dietas hipercalóricas ($p=0.01$) (Fig. 26).

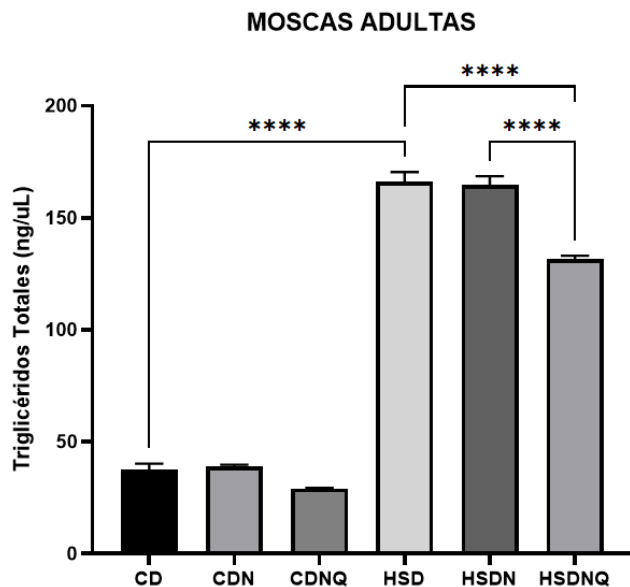


Fig. 26. TAG's totales n=5 animales por punto y 2 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes. Moscas de *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton S., fueron alimentadas por diez días con CD, CDN, CDNQ, HSD, HSDN o HSDNQ. (****) representa $p < 0.01$. Test de Mann-Whitney.

Concerniente al efecto metabólico sobre moscas adultas que estuvieron expuestas a HSD, destacamos un mayor contenido de TAG's en comparación con CD, lo que ha sido también descrito por otros autores como Baenas quien encontró un aumento significativo de TAG's en moscas adultas de 20 días alimentadas con HSD [102]. Además, Jianbo Na, encontró un aumento de TAG en moscas adultas que consumieron HSD respecto a CD [104]. Por su parte, en larvas L3, Musselman y Col., observó que, una HSD aumenta significativamente la cantidad de TAG's en larvas [61]. Lourido y Col., encontró un aumento de TAG's circulantes en L3 cuando estas consumieron HSD. Esto coincide con los resultados obtenidos en esta tesis, ya que notamos un aumento significativo en L3 alimentadas con HSD frente a CD [60].

En HSDNQ encontramos una reducción de TAG's en larvas L3 y moscas adultas en comparación con HSD. Esto también ha sido estudiado en otros modelos, por ejemplo, Eseberri demostró que, quercetina 1 y 10 μM es capaz de disminuir la acumulación de TAG's en adipocitos maduros [108]. En otro estudio hecho por Yang, administraron vía intraperitoneal quercetina en ratas con obesidad y diabetes inducida durante dos semanas y observaron una disminución significativa en los niveles de lípidos séricos como TAG's, colesterol total, LDL y VLDL [109]. En moscas adultas, Azuma reportó una disminución significativa de TAG's comparando una dieta hipercalórica

enriquecida con quercetina en contraste con CD y una dieta hipercalórica simple. Además, existen reportes de que plantas que tienen abundante presencia de quercetina y añadidas a una HSD, son capaces de disminuir la cantidad de triglicéridos tanto en hemolinfa como en el cuerpo completo de moscas adultas, esto ha sido estudiado por Ecker [110, 111].

Farag ha estudiado el efecto de las nanopartículas de quercetina sobre enzimas hepáticas e intestinales, así como en parámetros lipídicos sanguíneos en tilapias, observando una disminución significativa en colesterol total y triglicéridos [112].

La disminución en la acumulación de grasas no pudo atribuirse a cambios en la ingesta calórica de los animales, ya que no hubo diferencias en el consumo entre las dietas hipercalóricas.

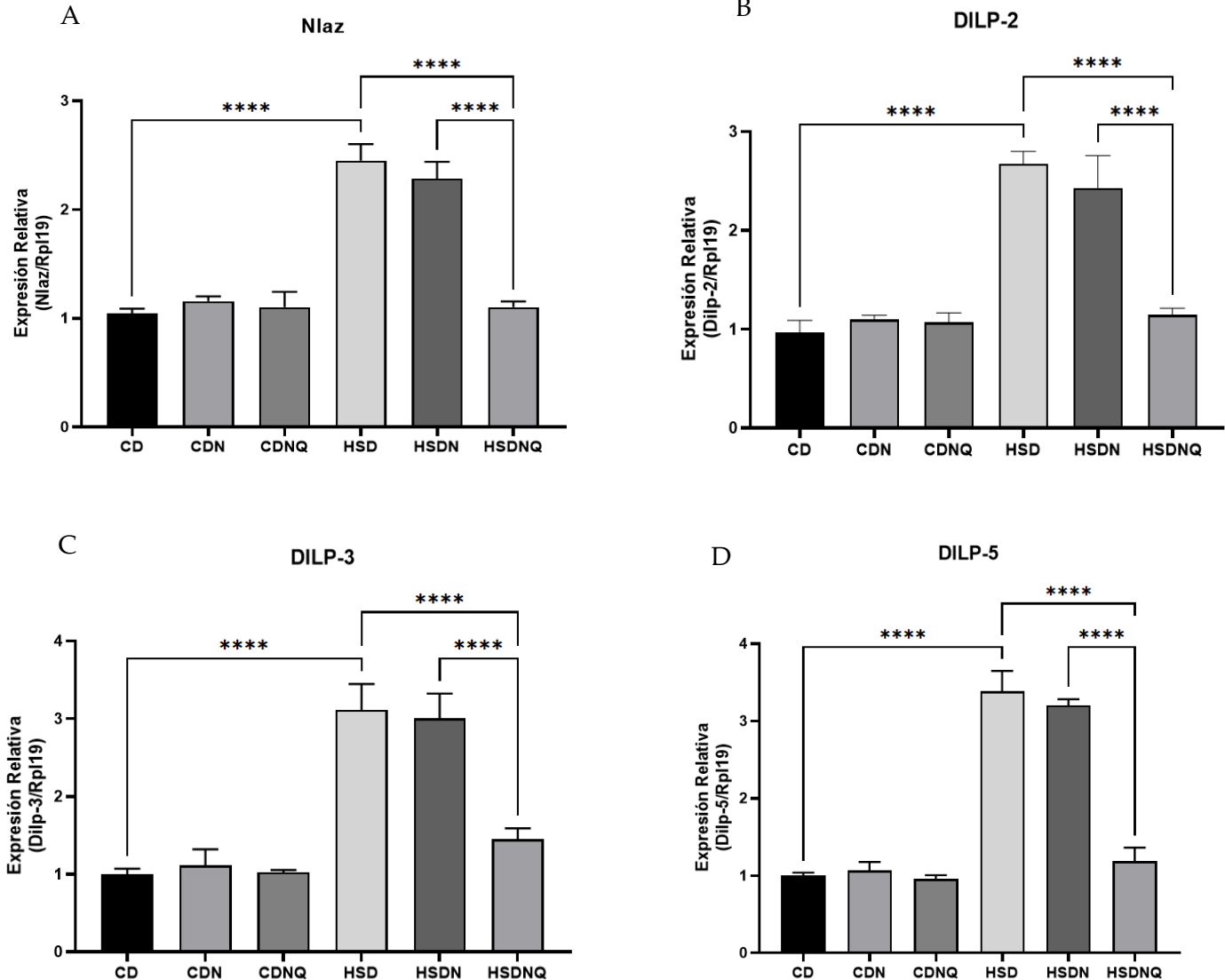
3.4.6 Expresión Genética

Diversas patologías y enfermedades crónicas degenerativas como el síndrome metabólico, la obesidad, hipertensión arterial y diabetes mellitus están asociadas a un aumento en la ingesta de calorías, es decir, dietas ricas en azúcares y grasas. Por su parte, los pacientes con DT2 llegan a padecer un estado crónico de inflamación que se manifiesta por el aumento en los niveles de citocinas circulantes. TNF- α , IL-6 alteran de forma directa la sensibilidad a la insulina activando diferentes pasos en la vía de señalización.

Estudiamos el efecto de nanopartículas de inulina cargadas con quercetina incorporadas a dietas control y dietas altas en azúcar sobre la expresión de marcadores biológicos relacionados con resistencia a la insulina, metabolismo de grasas, inflamación y estrés oxidativo en larvas L3 y moscas adultas. A continuación se muestran los resultados y su discusión en esta fase del proyecto:

Marcadores para Resistencia a la Insulina en L3 y moscas adultas de Dm

Al evaluar los marcadores para resistencia a la insulina (Nlaz), los péptidos similares a la insulina (Dilp-2, Dilp-3, Dilp-5, Dilp-6) y el marcador BMM, una proteína relacionada con la movilización de lípidos, encontramos que, en larvas (L3) y moscas adultas alimentadas con HSD y HSDN existe una mayor expresión de estos marcadores al compararlas con CD. Entre las dietas CD, CDN y CDNQ no se encontraron diferencias significativas ($p=0.001$). Por su parte, al hacer un comparativo entre las tres dietas hipercalóricas, se observa una menor expresión de estos marcadores en la dieta HSDNQ ($p=0.001$) (Fig. 27 y Fig. 28).



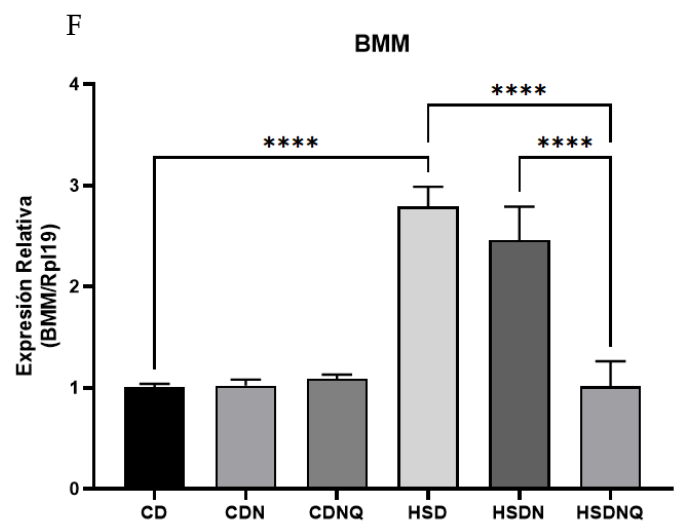
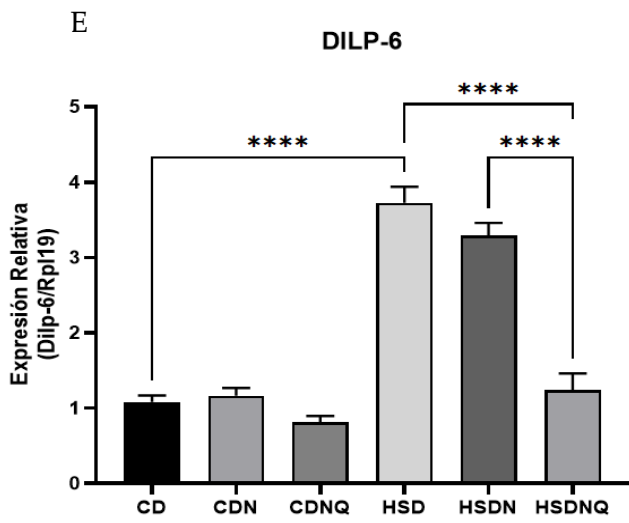
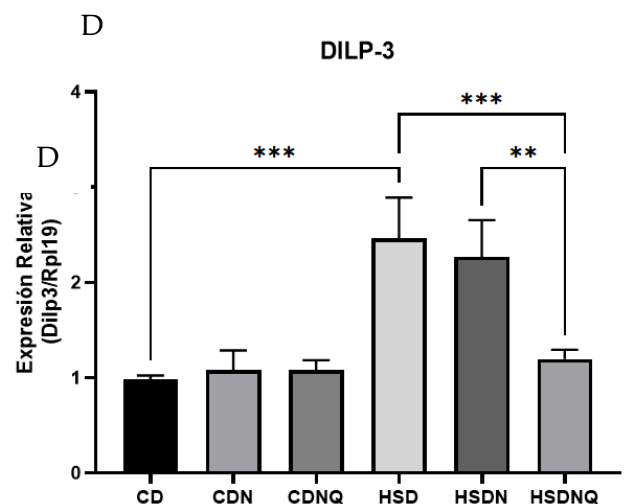
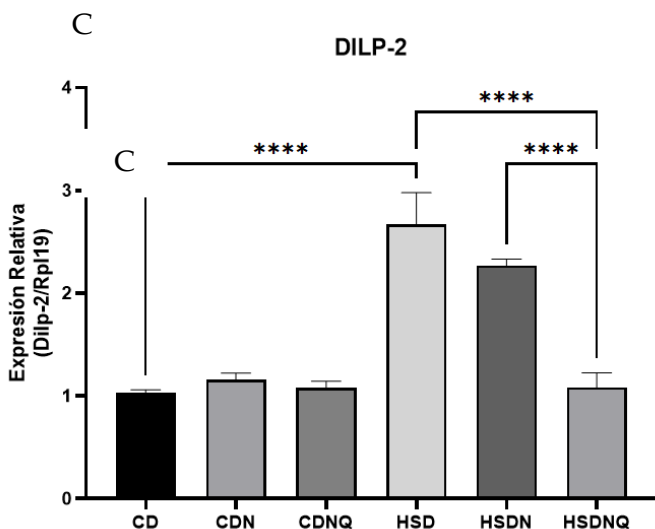
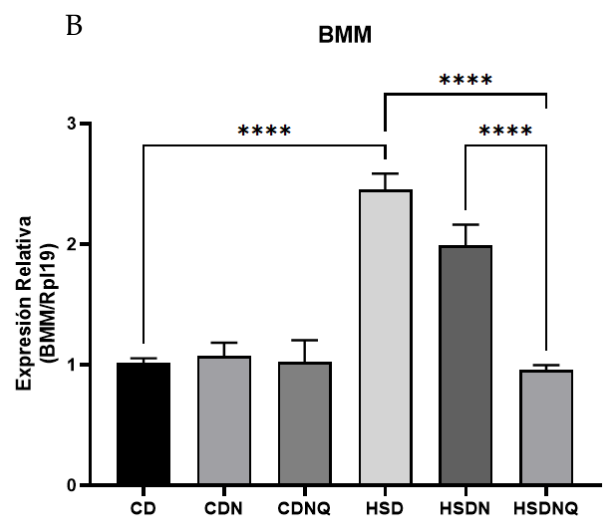
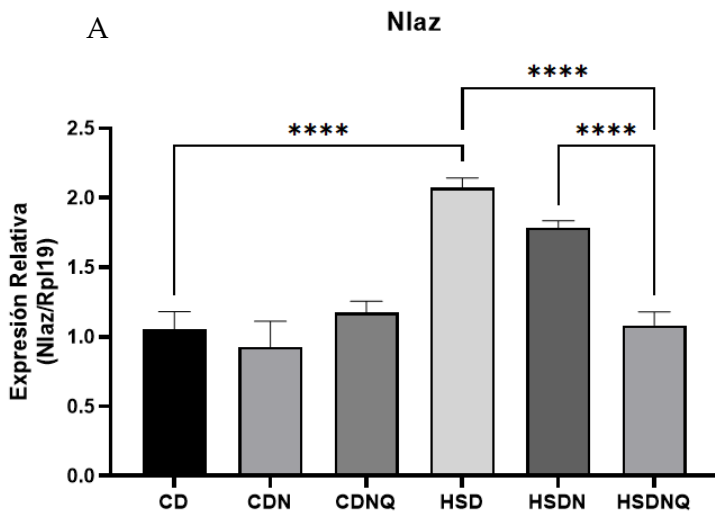


Fig. 27. Expresión relativa (RT-qPCR) de marcadores relacionados con la resistencia a la insulina en larvas (L3): A) Nlaz, B) Dilp-2, C) Dilp-3, D) Dilp-5, E) Dilp-6 y F) BMM, en el cuerpo completo (n = 30 larvas por grupo, en 3 experimentos independientes). Las barras representan la media \pm SD. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. **** p < 0.001.



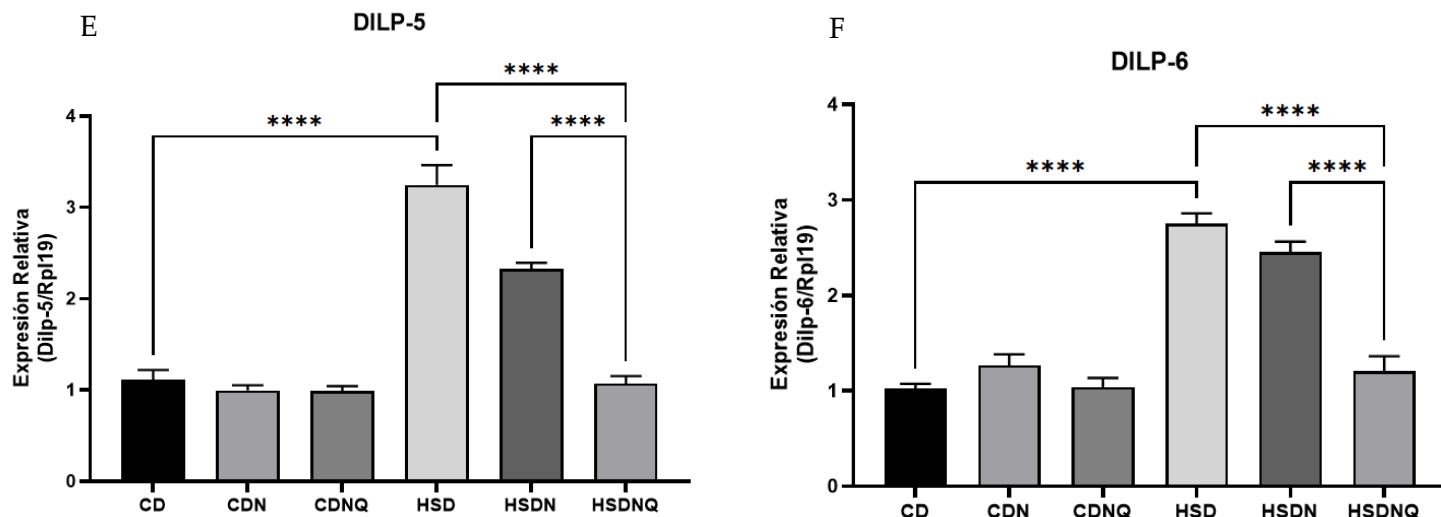


Fig. 28. Expresión relativa (RT-qPCR) de marcadores relacionados con la resistencia a la insulina en moscas adultas: A) Nlaz, B) Dilp-2, C) Dilp-3, D) Dilp-5, E) Dilp-6 y F) BMM, en el cuerpo completo (n = 25 moscas por grupo, en 3 experimentos independientes). Las barras representan la media \pm SD. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. **** $p < 0.001$, *** $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, con respecto a CD.

Evidenciamos un aumento en los marcadores Nlaz, Dilp-2, Dilp-3, Dilp-5, Dilp-6 y BMM cuando larvas de tercer estadio (L3) y moscas adultas fueron alimentadas con HSD respecto a CD y disminuyó su expresión en HSDNQ frente a HSD.

Dm produce ocho Dilp's diferentes, de los cuales se demostró que Dilp-1, 2, 3 y 5 tienen una función homóloga a la de la insulina de vertebrados y actúan en varios tejidos diana. Dilp-6 es más similar a los factores de crecimiento similares a la insulina de mamíferos. En la mosca adulta, las células productoras de insulina del sistema nervioso central, el intestino medio, los túbulos renales, el tejido adiposo, los ovarios y los ganglios abdominales producen Dilp's [47, 48].

Hull-Thomson es consistente con esto, y menciona que, la sobreexpresión de la proteína Nlaz está relacionada con un aumento en los niveles de glucosa y TAG's, entonces, ante el estrés del organismo, la expresión del marcador Nlaz se activa en el cuerpo graso [113]. Salgado observó que, una dieta hipercalórica induce un aumento en la expresión del gen Nlaz frente a CD, Lourido reportó el aumento en la expresión de los genes Nlaz, Dilp-2, Dilp-6 y BMM con una dieta HSD respecto a CD en L3 [114, 60].

Pasco, encontró un aumento en la expresión de los marcadores Dilp-2 y Dilp-5 en larvas alimentadas con HSD frente a CD [104]. Ecker alimentó a moscas con HSD suplementada con extractos ricos en glucósidos de quercetina y observó una disminución en la expresión del marcador Dilp-5 en contraste con HSD [115]. Nakitto encontró que, moscas alimentadas con HSD se evidencia un aumento de los genes Dilp-3 y Dilp-6, aunque, existe una disminución de estos marcadores en dietas HSD suplementadas con extractos ricos en quercetina [116]. Lo que sugiere que las larvas intentaron compensar el aumento de la carga glucémica aumentando los niveles de los Dilp's. Debido a que se ha demostrado que la secreción de insulina por parte de los IPC está controlada por la dieta.

Brummer o BMM es un homólogo de ATGL y altera la homeostasis de las grasas, resultando en una menor inhibición en la liberación de la grasa, concentrando la grasa en tejidos específicos. Destacamos el aumento del marcador BMM en larvas L3 y moscas adultas alimentadas con HSD y sin diferencias entre las dietas normocalóricas, esto coincide con el estudio reportado por Strillbytska, quien no encontró diferencias significativas entre una CD y una CD suplementada con glucósidos de quercetina [117]. De acuerdo con Azuma, la dieta hipercalórica con 20% de aceite de coco, induce la acumulación de grasa y los niveles de ARNm de varios genes relacionados con el metabolismo de lípidos y glucólisis se ven alterados cuando la dieta hipercalórica está suplementada con glucósidos de quercetina y galato de epicatequina [110].

Marcadores inflamatorios en L3 y moscas adultas de Dm

Considerando que la inflamación es un efecto esperado por el consumo de dietas hipercalóricas, además, evaluamos la expresión de como Eiger (homólogo de TNF- α), Puc, un blanco transcripcional de la vía JNK y los ligandos tipo citoquinas de la ruta

JAK/STAT (Upd, Upd-2 y Upd-3). Como vemos en las figura 29 (L3) y figura 30 (moscas adultas), existe una mayor expresión de estos marcadores en larvas y moscas alimentadas con HSD y HSDN. Al comparar las dietas normocalóricas, CD, CDN y CDNQ, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión. Sin embargo, al hacer un contraste entre las dietas hipercalóricas, la expresión de estos marcadores en HSDNQ fue significativamente menor al compararla con HSD y HSDN (Fig. 29 y Fig. 30).

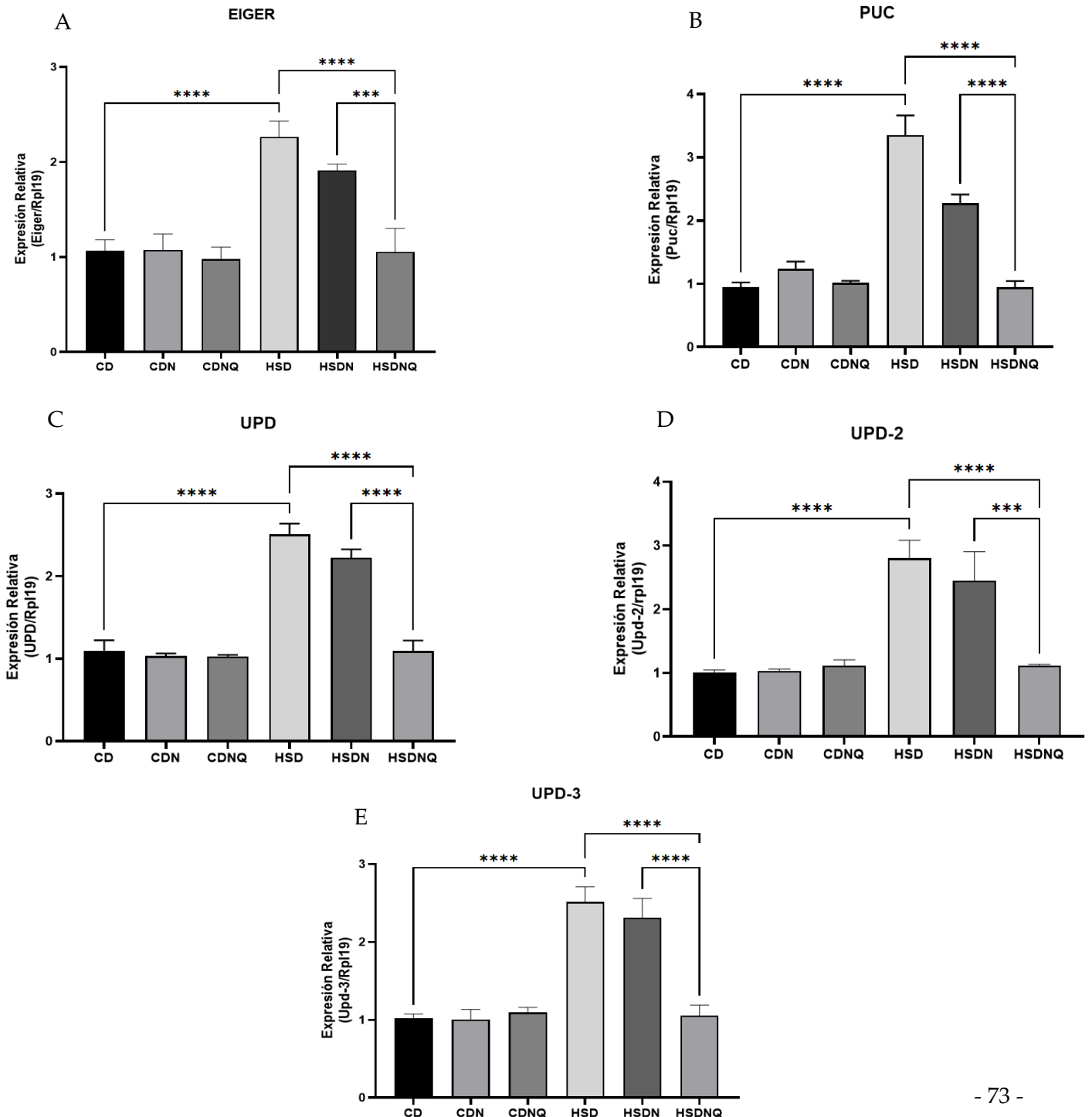


Fig. 29. Expresión relativa (RT-qPCR) de marcadores relacionados con la inflamación en L3: A) Eiger, B) Puc, C) Upd, D) Upd-2, y E) Upd-3, en el cuerpo completo (n = 30 larvas por grupo, en 3 experimentos independientes). Las barras representan la media \pm SD. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. **** p < 0.001.

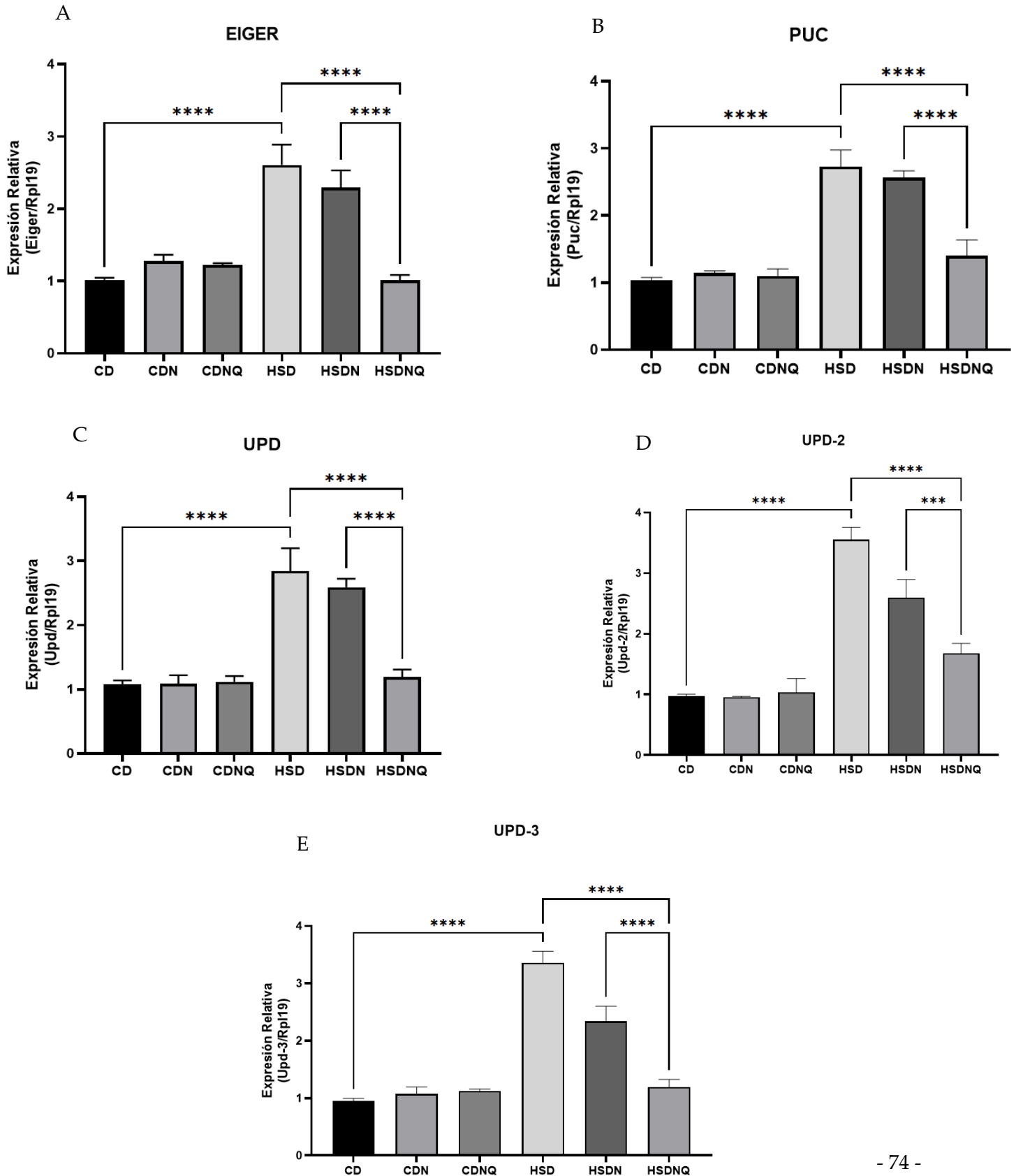


Fig. 30. Expresión relativa (RT-qPCR) de marcadores relacionados con la inflamación en moscas adultas: A) Eiger, B) Puc, C) Upd, D) Upd-2, y E) Upd-3, en el cuerpo completo (n = 25 moscas por grupo, en 3 experimentos independientes). Las barras representan la media \pm SD. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. **** p < 0,001, *** p < 0,01, con respecto a CD.

En este estudio se observó que, larvas L3 y moscas adultas, HSD aumenta la expresión relativa de marcadores como Eiger, homólogo de TNF- α , una citoquina proinflamatoria, Puc, Upd, Upd-2 y Upd-3 frente a CD. Los pacientes con DT2 llegan a padecer un estado crónico de inflamación que se manifiesta por el aumento en los niveles de citocinas circulantes. TNF- α , IL-6 alteran de forma directa la sensibilidad a la insulina activando diferentes pasos en la vía de señalización. De acuerdo con Lourido y Col., una dieta HSD induce una expresión temprana de Upd-2 y Eiger [60]. También, Pasco y Col., observó un aumento de Puc en larvas alimentadas con HSD en contraste con CD [115].

Concerniente con el estudio de Boesch, los principales metabolitos de quercetina e isorhamnetina tienen efectos en la expresión génica inflamatoria ya que, redujeron significativamente los niveles de ARNm de TNF- α , IL-1, IL-6 y NOS en macrófagos murinos [118]. Este hallazgo coincide con nuestros resultados en la evaluación de los marcadores inflamatorios ya que, observamos una disminución en la expresión de los homólogos de citoquinas, Upd, homólogo de Upd, Upd-2 y Upd-3 en HSD suplementada con nanopartículas de quercetina respecto a HSD.

Marcadores antioxidantes en L3 y moscas adultas de Dm

Respecto a los marcadores de actividad antioxidante, se observa una tendencia a aumentar la expresión de SOD-1 en las dietas HSD, HSDN y HSDNQ, sin embargo, no es significativo (p=0.001). Para SOD-2, se observa un aumento en la expresión para larvas y moscas adultas alimentadas con CDNQ y hay diferencia significativa en la expresión del marcador en HSDNQ en contraste con HSD (p=0.001), si la NanoQ se

absorbe eficientemente y libera quercetina en el entorno celular, podría aumentar la expresión de SOD-2 como parte de la respuesta antioxidante. Además, se observa una menor expresión de los marcadores CAT y GPX en larvas y moscas adultas alimentadas con HSD en comparación con CD ($p=0.001$). Además, se observa un aumento en la expresión del marcador en HSDNQ, en contraste con HSD ($p=0.001$). Al hacer la comparación entre los grupos HSDN y HSDNQ, se observa un aumento significativo en HSDNQ ($p=0.001$) Es decir, HSD promueve una disminución significativa respecto de CD, mientras que las NanoQ revierten parcial o completamente este efecto. (Fig. 31 y Fig. 32).

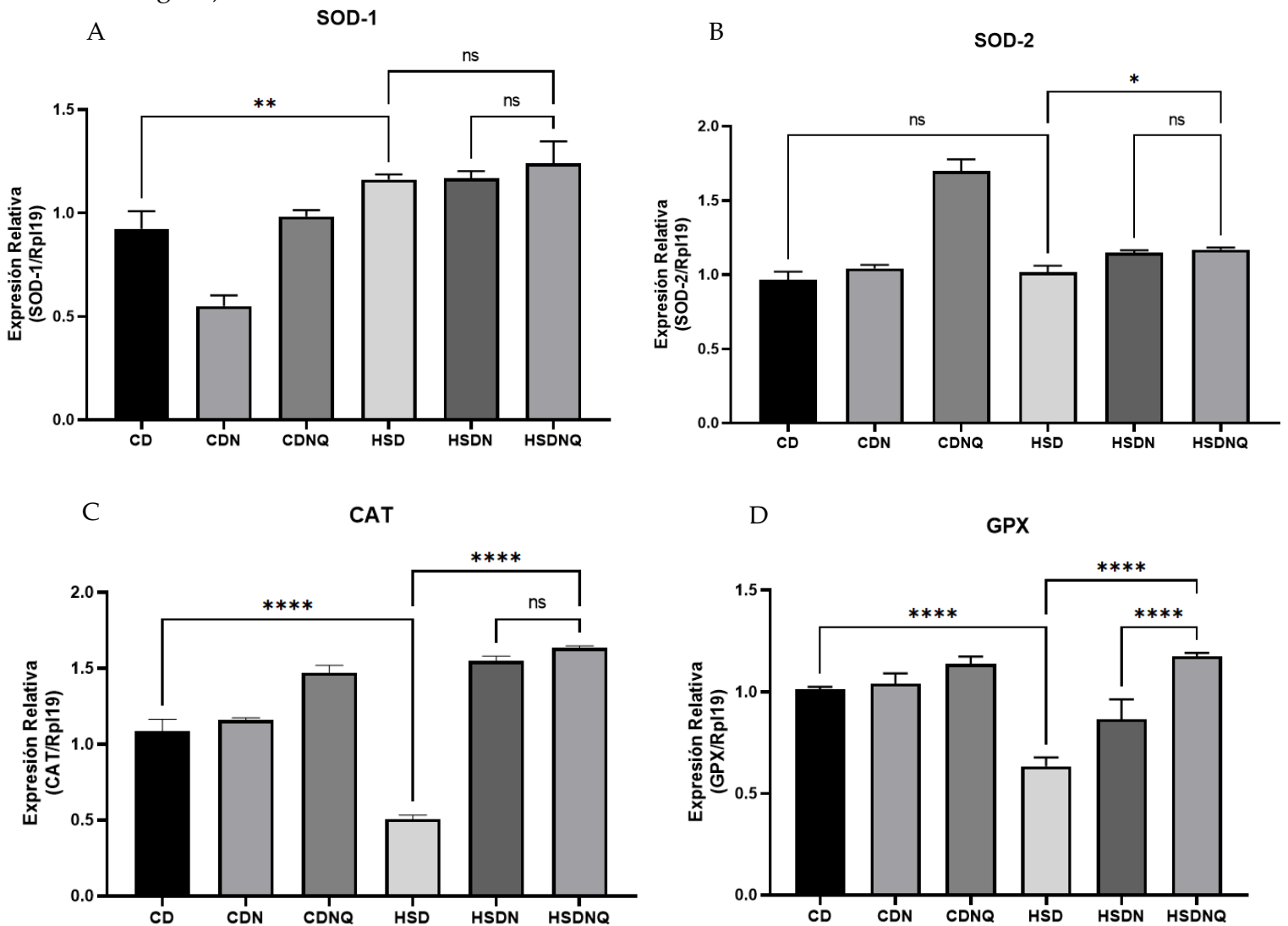


Fig. 31. Expresión relativa (RT-qPCR) de marcadores relacionados con actividad antioxidante en L3: A) SOD-1, B) SOD-2, C) CAT y D) GPX, en el cuerpo completo ($n = 30$ larvas por grupo, en 3 experimentos independientes). Las barras representan la media \pm SD. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p . **** $p < 0,001$, *** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, con respecto a CD.

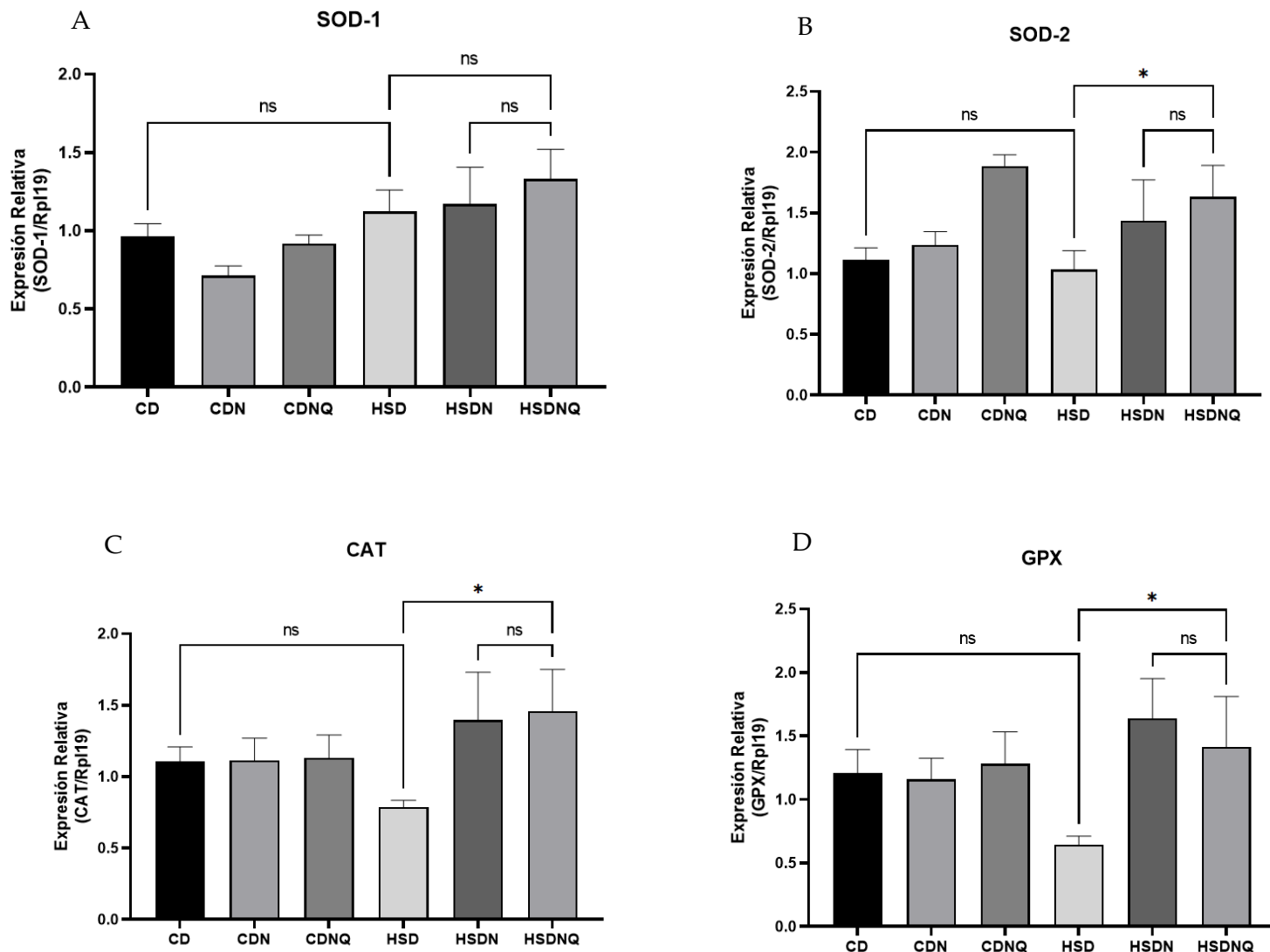


Fig. 32. Expresión relativa (RT-qPCR) de marcadores relacionados con actividad antioxidante en moscas adultas: A) SOD-1, B) SOD-2, C) CAT y D) GPX, en el cuerpo completo (n = 25 moscas por grupo, en 3 experimentos independientes). Las barras representan la media \pm SD. Se utilizó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para derivar todos los valores de p. * p < 0,05, con

De nuestros resultados podemos destacar que, la expresión del marcador SOD-1 es menor en CDN y existe un aumento significativo en HSD, HSDN y HSDNQ frente a CD. En contraste a los presentes resultados, Kobori demostró que, la alimentación con quercetina al 1% reduce la expresión de marcadores de peroxidación lipídica en hígado y tejido adiposo de ratones, además, encontró que se induce un aumento en la expresión de GPX1, CAT y SOD-1 en riñón, intestino delgado y músculo esquelético de ratones. Sin embargo, las dietas que utilizaron fueron solo controles sin alterar el estado

metabólico de los modelos murinos. Las diferencias observadas pueden deberse primeramente a que el modelo utilizado es diferente, en el presente estudio se observó el consumo de Nanopartículas cargadas con quercetina en *Drosophila melanogaster*, mientras que Kobori utilizó un modelo murino para probar el efecto de quercetina en su forma de aglicona. En segundo lugar, puede influir la concentración utilizada de quercetina ya que se ha reportado que la actividad antioxidante de quercetina, como de otros flavonoides tiene un comportamiento de horméis, es decir, a concentraciones bajas puede ejercer mayor efecto antioxidante que en concentraciones más altas [119].

CAT y SOD son las enzimas antioxidantes de primera línea ante una condición de estrés oxidativo y formación de radicales libres. Una dieta alta en azúcar puede conducir a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproducto del metabolismo de la glucosa. Este aumento en el estrés oxidativo puede agotar las enzimas antioxidantes, como la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), que normalmente funcionan para neutralizar los ROS.

De acuerdo con Lushchack, el alimentar larvas y moscas macho con dietas ricas en glucosa y fructosa inducen una mayor actividad de CAT pero una menor actividad de SOD [109]. Por su parte, Strillbytska reporta que, la actividad de SOD y CAT, en moscas adultas depende significativamente de la concentración de sacarosa en la dieta [120].

Un compuesto rico en glucósidos de quercetina agregado como suplemento a dietas HSD, induce una menor expresión de los marcadores SOD y CAT en larvas y moscas respecto a HSD con 30% de sacarosa [121]. Otro estudio del departamento de estudios en Zoología reportó que, el extracto de hojas de *Gymnema sylvestre*, que es rico en glucósidos de quercetina, agregado a una HSD con 30% de sacarosa revierte los cambios a un fenotipo normal después de que a las moscas se les indujo un fenotipo de estrés oxidativo y de insulino-resistencia en contraste con una HSD. Además, HSD induce un

incremento de la actividad de CAT y SOD, mientras que la adición del extracto inhibe su actividad frente a CD [122].

Trindade de Paula, reportó que una dieta HFD con aceite de coco al 10 y 20% inducen un aumento en la expresión de CAT y SOD, aunque no es significativa [123].

Rovenko en su artículo observó que, una dieta alta en azúcar induce la expresión de los marcadores SOD-1, SOD-2, y CAT en moscas adultas machos y hembras, aunque el comportamiento por género es diferente, porque la misma HSD disminuía la expresión en machos, mientras que en hembras, la expresión de los marcadores se incrementa de forma significativa [124].

Se ha demostrado que la quercetina tiene influencia en la regulación temporal de la homeostasis redox en moscas adultas de *Drosophila melanogaster*, de hecho, quercetina es capaz de revertir las características rítmicas en indicadores de estrés oxidativo como SOD, CAT y GPX, aunque estos marcadores mostraron variaciones temporales durante un periodo de 24 horas bajo estrés oxidativo, la suplementación con quercetina revertió las alteraciones en la ritmicidad gracias a su actividad neutralizando radicales libres [121].

En un modelo de peces, una dieta hipercalórica suplementada con quercetina y resveratrol, los niveles de expresión de los marcadores SOD, CAT y GPx aumentaron de forma significativa. Esto significa que el modelo está liberando estas enzimas de primera línea por el estado de estrés oxidativo generado por la dieta rica en calorías [125].

DISCUSIÓN FINAL DE RESULTADOS

Los resultados indican que una dieta alta en azúcar (HSD) tiene efectos negativos en larvas de tercer estadio (L3) y moscas adultas de 10 y 20 días, generando daño metabólico, manifestado en niveles elevados de glucosa en hemolinfa. No obstante, la suplementación con nanopartículas de quercetina parece mitigar este efecto, induciendo una disminución significativa en los niveles de glucosa en comparación con las dietas sin quercetina. Estos hallazgos sugieren un potencial beneficio de la quercetina en la mitigación del daño metabólico asociado con el consumo de una dieta alta en azúcar. Además, la densidad calórica en todas las dietas ricas en azúcar es un 64% mayor (Kcal/ μ L de alimento), destacando la importancia de considerarla al interpretar los datos de ingesta para obtener una visión completa de la energía consumida, a pesar de las variaciones en el volumen de alimento ingerido. Al examinar la relación entre los niveles de glucosa circulante y la cantidad de alimento consumido por larvas del tercer estadio (L3), se observa un aumento significativo en las larvas alimentadas con una dieta alta en azúcar (HSD) en comparación con la dieta control (CD). Estos resultados sugieren que el efecto hipoglucemiante no se debe a diferencias en la cantidad de alimento ingerido, sino al compuesto bioactivo presente en las nanopartículas de quercetina/inulina. Por su parte, los resultados revelan una disminución significativa en el peso de larvas del tercer estadio (L3) y moscas adultas alimentadas con HSD, HSDN y HSDNQ en comparación con los grupos CD, CDN y CDNQ. Es importante señalar que la ganancia de peso no parece ser el parámetro más apropiado para definir la obesidad en las moscas, ya que el retardo en el crecimiento influye negativamente en el peso. Este hallazgo destaca la necesidad de considerar múltiples parámetros fisiológicos al evaluar el impacto de las dietas en el desarrollo y el peso de las larvas y moscas adultas.

Los trastornos fisiológicos inducidos por el consumo de dietas hipercalóricas pueden impactar directamente en la esperanza de vida. Los resultados obtenidos en este proyecto parcialmente coinciden con estudios anteriores. Contrario a lo esperado, donde se anticipaba que los fenotipos de obesidad y resistencia a la insulina en moscas adultas alimentadas con HSD afectarían su vida media, las moscas expuestas a HSDNQ aumentaron su vida útil en comparación con HSD, y CDNQ mejoró la vida útil en contraste con CD. Estos hallazgos sugieren que la suplementación con nanopartículas de quercetina puede tener un impacto positivo en la longevidad de las moscas expuestas a una dieta alta en azúcar.

En relación con el efecto metabólico en moscas adultas expuestas a HSD, se destacó un aumento en el contenido de triglicéridos en comparación con aquellas alimentadas con CD, entonces, podemos sugerir que, la suplementación con nanopartículas cargadas con quercetina (HSDNQ) puede atenuar el aumento de triglicéridos observado en respuesta a la dieta hipercalórica en larvas L3 y moscas adultas, presentando un efecto modulador beneficioso.

Es particularmente interesante destacar que no se encontraron diferencias significativas entre las dietas CD, CDN y CDNQ lo que sugiere que la presencia de quercetina e inulina no tuvo un impacto notable en la expresión de estos marcadores en comparación con la dieta control. Sin embargo, al realizar comparaciones entre las dietas hipercalóricas, se observó una disminución significativa en la expresión de los marcadores mencionados anteriormente en la dieta HSDNQ en comparación con la HSD, lo cual podría indicar un efecto modulador de la quercetina e inulina en la respuesta asociada con la resistencia a la insulina en este contexto específico.

Los resultados presentados indican que el consumo de dietas hipercalóricas está asociado con un aumento significativo en la expresión de marcadores inflamatorios en larvas L3 y moscas adultas, especialmente con dietas ricas en azúcar (HSD) y en azúcar

con nanopartículas (HSDN). En comparación con las dietas normocalóricas (CD, CDN y CDNQ), no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de estos marcadores. La relación entre la inflamación y la resistencia a la insulina es particularmente destacada en la discusión, respaldada por la evidencia de que pacientes con diabetes tipo 2 (DT2) experimentan un estado crónico de inflamación caracterizado por el aumento en los niveles de citocinas circulantes, como TNF- α e IL-6, que directamente afectan la sensibilidad a la insulina al activar diferentes pasos en la vía de señalización.

Es relevante destacar que la expresión de SOD-1 es menor en CDN, mientras que experimenta un aumento significativo en HSD, HSDN y HSDNQ en comparación con CD. Estos hallazgos, aunque sugieren una tendencia al aumento en la actividad antioxidante en presencia de las dietas hipercalóricas y las nanopartículas, subrayan la complejidad de los efectos observados. En última instancia, la discusión de CAT y SOD como enzimas antioxidantes de primera línea en respuesta a condiciones de estrés oxidativo y formación de radicales libres destaca la importancia de entender la compleja interacción entre la dieta, los compuestos y la respuesta antioxidantes del organismo.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la compleja interacción entre la dieta, la inflamación, la resistencia a la insulina y la actividad antioxidante, brindando información valiosa para comprender los mecanismos subyacentes y explorar posibles enfoques terapéuticos o preventivos. Estos resultados contribuyen a la comprensión de los mecanismos de defensa antioxidante en el contexto de dietas hipercalóricas y la incorporación de nanopartículas con quercetina. Además, nos parece que la adición de quercetina nanoencapsulada a la dieta contribuyó a una reversión hacia un fenotipo normal y mejoró la respuesta metabólica a una HSD.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

Los resultados de este estudio han revelado hallazgos significativos que respaldan nuestra hipótesis de trabajo. Las nanopartículas de quercetina, conocidas como NanoQ, demostraron tener un impacto importante en las células Caco-2 y Huh-7, así como en un modelo de *Drosophila melanogaster* con daño metabólico inducido por una dieta alta en azúcar.

En primer lugar, observamos que las NanoQ provocaron una disminución en la señal del biosensor HyPer, lo que interpretamos como un cambio en el tono reductor del citoplasma de las células Caco-2 a concentraciones de 2.5-100 μM . Este cambio, se explica en parte a un aumento de la capacidad antioxidante del citoplasma, ya que a diferencia de las nanopartículas de inulina (NInu), las NanoQ aceleraron la tasa de recuperación del biosensor a partir de su máxima oxidación, es decir, fue más rápida para las NanoQ en células Caco-2 intactas expuestas de forma aguda y crónica.

También cabe destacar que las NanoQ y NInu no provocaron cambios en la actividad citosólica de calcio intracelular, lo que indica que el efecto antioxidante observado no es mediado por la señalización de calcio celular.

En cuanto a la viabilidad celular, el ensayo MTT mostró resultados interesantes. Las NanoQ mostraron una viabilidad celular más significativa a concentraciones de 120 nM a 24 horas en células Caco-2, y a las 48 horas, esta tendencia se observó a 15 nM. En las células Huh-7, las NanoQ también mostraron una viabilidad celular superior al 70% en todas las concentraciones a 24 y 48 horas.

Por último, nuestras observaciones en larvas de tercer estadio y moscas adultas con daño metabólico inducido por una dieta alta en azúcar revelaron que las NanoQ tienen un efecto positivo en la regulación de la glucosa, triglicéridos y en los marcadores de resistencia a la insulina, inflamación y antioxidantes. Además, la adición de NanoQ a una dieta control o una dieta alta en azúcar mejoró la vida media de las moscas adultas,

y el efecto hipoglucemiante se debió al efecto de las NanoQ, no a la diferencia en la cantidad de alimento ingerida.

En resumen, nuestros hallazgos respaldan la hipótesis de trabajo, demostrando que las nanopartículas de quercetina, las NanoQ, poseen efectos antioxidantes en modelos de células de cáncer de colon e hígado, así como efectos antiinflamatorios en el metabolismo lipídico de *Drosophila melanogaster*. Estos resultados sugieren un potencial terapéutico y un camino prometedor para futuras investigaciones en el campo de la nanomedicina y la salud metabólica.

PERSPECTIVAS Y TRABAJO A FUTURO

- Analizar transcritos y otros parámetros en diferentes partes del cuerpo de las moscas adultas.
- Evaluar el efecto de nanoencapsulados en moscas adultas dividiendo a los modelos por sexos, esto nos da mayor grado de variabilidad y complejidad biológica.
- Profundizar en los mecanismos asociados a los resultados encontrados mediante la utilización de herramientas genéticas.

CAPÍTULO V

ANEXOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anexo 1. Composición dietaria y aporte calórico.

		Dieta Control (CD)	Dieta alta en azúcar (HSD)
Componentes dietarios	Agar	1%	1%
	Levadura de cerveza	8%	8%
	Extracto de levadura	2%	2%
	Peptona	2%	2%
	Sacarosa	5.1%	34.2%
	Sulfato de Magnesio	0.05%	0.05%
	Cloruro de Calcio	0.05 %	0.05 %
	Ácido propiónico	0.6%	0.6%
	Nipagin	1.1%	1.1%
Distribución de macronutrientes	% carbohidratos	63.9%	86.4%
	% grasas	1.1%	0.4%
	% proteínas	34%	13.2%
Kilocalorías	Kilocalorías totales	702.6	1866.6

*Las dietas enriquecidas con inulina y quercetina nanoencapsulada tienen 0.05% de Nanoinulina y 0.05% de NanoQ respectivamente, tanto para CD como para HSD.

Anexo 2. Paper propuesto para publicación.

Title: Quercetin nanoparticles exhibit an anti-inflammatory effect on larvae and flies of *Drosophila melanogaster* with metabolic dysfunction induced by a diet high in sugar.

Authors: Aldo Leyva-Soto¹, Rocio Alejandra Chavez-Santoscoy², Ana Alejandra Ramírez-Rodríguez¹, Samantha Ottani-Rhein³, Nicolás Tobar-Bächler^{3*}.

¹ Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California (UABC) – Campus Tijuana, Calzada Universidad 14418, Parque Industrial Internacional Tijuana, 22390 Tijuana, B.C., Mexico.

² Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, C.P. 64849 Monterrey, N.L., Mexico.

³ Cellular Biology Laboratory, Institute of Nutrition and Food Technology (INTA), University of Chile, Av. El Líbano, 5524, Macul, Santiago, Chile.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. (9 de diciembre de 2022). The top 10 causes of death. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, consultado el 06 de junio de 2022.
2. Escobar, M. C., Petrásovits, A., Peruga, A., Silva, N., Vives, M., & Robles, S. (2000). Mitos sobre la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles en América Latina. *salud pública de México*, 42(1), 56-64.
3. Patel, H., & Patel, V. H. (2015). Inflammation and metabolic syndrome-an overview. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 3(3), 263-268.
4. Welty, F. K., Alfaddagh, A., & Elajami, T. K. (2016). Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Translational research*, 167(1), 257-280.
5. Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*, 2010.
6. Tracy, R. P. (2003). Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk. *International journal of clinical practice. Supplement*, (134), 10-17.
7. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
8. Ayala-Fuentes, J. C., & Chavez-Santoscoy, R. A. (2021). Nanotechnology as a Key to Enhance the Benefits and Improve the Bioavailability of Flavonoids in the Food Industry. *Foods*, 10(11), 2701.
9. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
10. Liu, R. H. (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in nutrition*, 4(3), 384S-392S.
11. Ribeiro, D., Freitas, M., Lima, J. L., & Fernandes, E. (2015). Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. *Medicinal research reviews*, 35(5), 877-936.
12. Rizvi, S. I., & Zaid, M. A. (2001). Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: effect of insulin and (-) epicatechin. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52(3).
13. Rizvi, S. I., & Zaid, M. A. (2005). Impairment of sodium pump and Na/H exchanger in erythrocytes from non-insulin dependent diabetes mellitus patients: effect of tea catechins. *Clinica Chimica Acta*, 354(1-2), 59-67.
14. Johnson, I. T., Williamson, G., & Musk, S. R. R. (1994). Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients?. *Nutrition Research Reviews*, 7(1), 175-204.
15. Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., ... & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic

- modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*, 71(5), 1062-1076.
16. García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation research*, 58(9), 537-552.
 17. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., ... & Yin, Y. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, 8(3), 167.
 18. Kelly, G. S. (2011). Quercetin. *Alternative medicine review*, 16(2), 172-195.
 19. Bentz, A. B. (2017). A Review of quercetin: chemistry, antioxidant properties, and bioavailability. *Journal of young investigators*.
 20. Davis, J. M., Murphy, E. A., & Carmichael, M. D. (2009). Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Current sports medicine reports*, 8(4), 206-213.
 21. Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080.
 22. Kaşıkçı, M. B., & Bağdatlıoğlu, N. (2016). Bioavailability of quercetin. *Current research in nutrition and food science journal*, 4(Special Issue Nutrition in Conference October 2016), 146-151.
 23. de Boer, V. C., Dihal, A. A., van der Woude, H., Arts, I. C., Wolffram, S., Alink, G. M., & Hollman, P. C. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of nutrition*, 135(7), 1718-1725.
 24. Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*, 16(1), 77-84.
 25. Franck, A., & Bosscher, D. (2009). Inulin. In *Fiber Ingredients* (pp. 55-74). CRC Press.
 26. Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they?. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1402S-1406S.
 27. Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., ... & Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate polymers*, 147, 444-454.
 28. Cherbut, C. (2002). Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S159-S162.
 29. Ramsden, J. (2016). *Nanotechnology: an introduction*. William Andrew.
 30. Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.
 31. McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of leukocyte biology*, 78(3), 585-594.
 32. Emerich, D. F., & Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert opinion on biological therapy*, 3(4), 655-663.

33. Ashraf, S. A., Siddiqui, A. J., Abd Elmoneim, O. E., Khan, M. I., Patel, M., Alreshidi, M., ... & Adnan, M. (2021). Innovations in nanoscience for the sustainable development of food and agriculture with implications on health and environment. *Science of the Total Environment*, 768, 144990.
34. Pradhan, N., Singh, S., Ojha, N., Shrivastava, A., Barla, A., Rai, V., & Bose, S. (2015). Facets of nanotechnology as seen in food processing, packaging, and preservation industry. *BioMed research international*, 2015.
35. Dos Santos, P. P., Flores, S. H., de Oliveira Rios, A., & Chiste, R. C. (2016). Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in food science & technology*, 53, 23-33.
36. Rizvi, S. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi pharmaceutical journal*, 26(1), 64-70.
37. Hao, J., Guo, B., Yu, S., Zhang, W., Zhang, D., Wang, J., & Wang, Y. (2017). Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 37-44.
38. Arpagaus, C., Collenberg, A., Rütli, D., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2018). Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *International journal of pharmaceutics*, 546(1-2), 194-214.
39. Kumari, A., Yadav, S. K., Pakade, Y. B., Singh, B., & Yadav, S. C. (2010). Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80(2), 184-192.
40. Li, H., Zhao, X., Ma, Y., Zhai, G., Li, L., & Lou, H. (2009). Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133(3), 238-244.
41. Khater, S. I., Lotfy, M. M., Alandiyjany, M. N., Alqahtani, L. S., Zagloul, A. W., Althobaiti, F., ... & Ibrahim, D. (2022). Therapeutic potential of quercetin loaded nanoparticles: Novel insights in alleviating colitis in an experimental DSS induced colitis model. *Biomedicines*, 10(7), 1654.
42. Sánchez-Jaramillo, E. A., Gasca-Lozano, L. E., Vera-Cruz, J. M., Hernández-Ortega, L. D., Gurrola-Díaz, C. M., Bastidas-Ramírez, B. E., ... & Salazar-Montes, A. M. (2022). Nanoparticles Formulation Improves the Antifibrogenic Effect of Quercetin on an Adenine-Induced Model of Chronic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5392.
43. Leyva-Soto, A., Chavez-Santoscoy, R. A., Porras, O., Hidalgo-Ledesma, M., Serrano-Medina, A., Ramírez-Rodríguez, A. A., & Castillo-Martinez, N. A. (2021). Epicatechin and quercetin exhibit in vitro antioxidant effect, improve biochemical parameters related to metabolic syndrome, and decrease cellular genotoxicity in humans. *Food Research International*, 142, 110101.

44. Green, M. M. (2002). It really is not a fruit fly. *Genetics*, 162(1), 1-3.
45. Britannica, T. Editors of Encyclopedia (2020, May 19). vinegar fly. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/animal/vinegar-fly> consultado el 15 de septiembre de 2022.
46. Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold spring harbor laboratory press.
47. Jennings, B. H. (2011). *Drosophila—a versatile model in biology & medicine*. *Materials today*, 14(5), 190-195.
48. Bilder, D., & Irvine, K. D. (2017). Taking stock of the *Drosophila* research ecosystem. *Genetics*, 206(3), 1227-1236.
49. Carreira, V. P., Soto, I. M., Mensch, J., & Fanara, J. J. (2011). Genetic basis of wing morphogenesis in *Drosophila*: sexual dimorphism and non-allometric effects of shape variation. *BMC developmental biology*, 11(1), 1-16.
50. Asahina, K. (2018). Sex differences in *Drosophila* behavior: qualitative and quantitative dimorphism. *Current Opinion in Physiology*, 6, 35-45.
51. Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: a primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*, 201(3), 815-842.
52. Tyler, M. S. (2000). Development of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology: A guide for experimental study*, 85-106. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA., ISBN 0-87893-843-5
53. Tennessen, J. M., Barry, W. E., Cox, J., & Thummel, C. S. (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*, 68(1), 105-115.
54. Trinh, I., & Boulianne, G. L. (2013). Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. *Physiology*, 28(2), 117-124.
55. Mattila, J., & Hietakangas, V. (2017). Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 207(4), 1231-1253.
56. Fernández-Almonacid, R. A. F. A. E. L., & Rosen, O. M. (1987). Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 7(8), 2718-2727.
57. Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodríguez, J., Graham, S., Diop, S., ... & Oldham, S. (2010). High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 12(5), 533-544.
58. Reed, L. K., Williams, S., Springston, M., Brown, J., Freeman, K., DesRoches, C. E., ... & Gibson, G. (2010). Genotype-by-diet interactions drive metabolic phenotype variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 185(3), 1009-1019.
59. Alfa, R. W., & Kim, S. K. (2016). Using *Drosophila* to discover mechanisms underlying type 2 diabetes. *Disease models & mechanisms*, 9(4), 365-376.

60. Lourido, F., Quenti, D., Salgado-Canales, D., & Tobar, N. (2021). Domeless receptor loss in fat body tissue reverts insulin resistance induced by a high-sugar diet in *Drosophila melanogaster*. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.
61. Musselman, L. P., & Kühnlein, R. P. (2018). *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl_1), jeb163881.
62. Palanker Musselman, L., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Sukumar Hathiramani, S., Cagan, R. L., & Baranski, T. J. (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*, 4(6), 842-849.
63. Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 151-172). Academic Press.
64. Helgason, C. D., & Miller, C. L. (2005). *Basic cell culture protocols*. Totowa, NJ.: Humana Press.
65. Hernández, H., Parra, A., Tobar, N., Molina, J., Kallens, V., Hidalgo, M., ... & Porras, O. (2018). Insights into the HyPer biosensor as molecular tool for monitoring cellular antioxidant capacity. *Redox biology*, 16, 199-208.
66. Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. *The impact of food bioactives on health*, 103-111.
67. Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F., & Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in vitro*, 26(8), 1243-1246.
68. Sainz, B., TenCate, V., & Uprichard, S. L. (2009). Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology journal*, 6(1), 1-8.
69. Fabian, S., & Isimar, J. (2020). Evaluación de la línea celular Huh7 como modelo de resistencia a la insulina determinado por diversos biomarcadores en comparación con HepG2 (Master's thesis, Universidad Autónoma de Guerrero (México)).
70. Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2014). Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon)* 42 (12): 698–702.
71. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2021). Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2021. Publicado el 24 de enero de 2022. Comunicado de prensa No. 24/22 pp. 3-10. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/boletines/dr2021> consultado el 26 de julio de 2023.
72. Musselman L.P. Feeding Assay- blue food. USA. [Consultado noviembre 2022]. Disponible en: <http://musselmanlab.com/index.php/protocols/>
73. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9): e45.
74. Neural Lazarillo. (s. f.). <https://www.sdbonline.org/sites/fly/genebrief/neurallaz.htm> consultado el 14 de noviembre de 2023.
75. Unpaired 1, 2 & 3. (s. f.). <https://www.sdbonline.org/sites/fly/dbzhnsky/outstrh1.htm> consultado el 14 de noviembre de 2023.

76. Grönke, S., Clarke, D. F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS genetics*, 6(2), e1000857. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000857>
77. Eiger. (s. f.). <https://www.sdbonline.org/sites/fly/hjmuller/eiger1.htm> consultado el 14 de noviembre de 2023.
78. Interactive Fly, *Drosophila*. (s. f.-c). <https://www.sdbonline.org/sites/fly/torstoll/puckrd1.htm> consultado el 14 de noviembre de 2023.
79. Brummer. (s. f.). <https://www.sdbonline.org/sites/fly/genebrief/brummerlipase.htm> consultado el 14 de noviembre de 2023.
80. Landis, G. N., & Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(3), 365-379. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.08.012>
81. Cat catalase [*Drosophila melanogaster* (fruit fly)] - gene - NCBI. (s. f.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=search&tool=FlyBase&term=40048> consultado el 14 de noviembre de 2023.
82. PHGPX [*Drosophila melanogaster* (fruit fly)] - gene - NCBI. (s. f.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=search&tool=FlyBase&term=38413> consultado el 14 de noviembre de 2023.
83. Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., & Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature methods*, 3(4), 281-286.
84. Kellett, M. E., Greenspan, P., & Pegg, R. B. (2018). Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. *Food chemistry*, 244, 359-363.
85. Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology*, 232, 103-111.
86. Kameníková, M., Furtmüller, P. G., Klacsová, M., Lopez-Guzman, A., Toca-Herrera, J. L., Vitkovská, A., ... & Nagy, M. (2017). Influence of quercetin on the interaction of gliclazide with human serum albumin—spectroscopic and docking approaches. *Luminescence*, 32(7), 1203-1211.
87. Hidalgo, M., Rodríguez, V., Kreindl, C., & Porras, O. (2020). Biological redox impact of tocopherol isomers is mediated by fast cytosolic calcium increases in living Caco-2 cells. *Antioxidants*, 9(2), 155.
88. Ai, Z., Liu, S., Qu, F., Zhang, H., Chen, Y., & Ni, D. (2019). Effect of stereochemical configuration on the transport and metabolism of catechins from green tea across Caco-2 monolayers. *Molecules*, 24(6), 1185.

89. Rozanski, M., Studzian, M., & Pulaski, L. (2019). Direct measurement of kinetic parameters of ABCG2-dependent transport of natural flavonoids using a fluorogenic substrate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 371(2), 309-319.
90. Omidian, K., Rafiei, H., & Bandy, B. (2020). Increased mitochondrial content and function by resveratrol and select flavonoids protects against benzo [a] pyrene-induced bioenergetic dysfunction and ROS generation in a cell model of neoplastic transformation. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 767-775.
91. Yousefian, M., Shakour, N., Hosseinzadeh, H., Hayes, A. W., Hadizadeh, F., & Karimi, G. (2019). The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. *Phytomedicine*, 55, 200-213.
92. Devipriya, S., Vani, G., Ramamurthy, N., & Shyamaladevi, C. S. (2006). Regulation of intracellular calcium levels and urokinase activity in MDA MB 231 cells by quercetin. *Chemotherapy*, 52(2), 60-65.
93. Jiménez-Sánchez, M., Pérez-Morales, R., Goycoolea, F. M., Mueller, M., Praznik, W., Loeppert, R., ... & Olvera, C. (2019). Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: Enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties. *Carbohydrate polymers*, 215, 160-169.
94. Li, X., Zhou, P., Luo, Z., Feng, R., & Wang, L. (2022). *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides self-assembled nanoparticles for delivery of quercetin and their anti-proliferative activities during gastrointestinal digestion in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 203, 244-255.
95. Hemmati, M., Mostafavi, S. E., Zarban, A., & Hoshyar, R. (2018). Protective effects of quercetin on hyperglycemia and stress proteins expression in rats with streptozocin-induced diabetes. *Modern Care Journal*, 15(2).
96. Liu, J., Lu, J. F., Kan, J., Wen, X. Y., & Jin, C. H. (2014). Synthesis, characterization and in vitro anti-diabetic activity of catechin grafted inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 76-83.
97. Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M., & Taper, H. S. (2002). Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and prospects. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S255-S259.
98. Yapici, N. (2023). Eating regulation: How diet impacts food cognition. *Current Biology*, 33(4), R153-R156.
99. Edgecomb, R. S., Harth, C. E., & Schneiderman, A. M. (1994). Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *The Journal of experimental biology*, 197(1), 215-235.
100. Davis, J. D., & Perez, M. C. (1993). Food deprivation-and palatability-induced microstructural changes in ingestive behavior. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 264(1), R97-R103.

101. Skorupa, D. A., Dervisefendic, A., Zwiener, J., & Pletcher, S. D. (2008). Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell*, 7(4), 478-490.
102. Baenas, N., & Wagner, A. E. (2022). *Drosophila melanogaster* as a model organism for obesity and type-2 diabetes mellitus by applying high-sugar and high-fat diets. *Biomolecules*, 12(2), 307.
103. Gálíková, M., & Klepsatel, P. (2018). Obesity and aging in the *Drosophila* model. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1896.
104. Na, J., Musselman, L. P., Pendse, J., Baranski, T. J., Bodmer, R., Ocorr, K., & Cagan, R. (2013). A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS genetics*, 9(1), e1003175.
105. Zhang, D., Shan, J., Liang, B., Zhong, L., Tang, H., Xu, Y., ... & Shen, J. (2022). Senolytic Drug Quercetin Rescues Survival from Blue Light Toxicity in *Drosophila* Model. *Photochemistry and Photobiology*.
106. Kong, Y., Li, K., Fu, T., Wan, C., Zhang, D., Song, H., ... & Yuan, L. (2016). Quercetin ameliorates A β toxicity in *Drosophila* AD model by modulating cell cycle-related protein expression. *Oncotarget*, 7(42), 67716.
107. Proshkina, E., Lashmanova, E., Dobrovolskaya, E., Zemskaya, N., Kudryavtseva, A., Shaposhnikov, M., & Moskalev, A. (2016). Geroprotective and radioprotective activity of quercetin, (-)-epicatechin, and ibuprofen in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in pharmacology*, 7, 505.
108. Eseberri, I., Miranda, J., Lasa, A., Mosqueda-Solís, A., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., & Portillo, M. P. (2019). Effects of quercetin metabolites on triglyceride metabolism of 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 264.
109. Yang, D. K., & Kang, H. S. (2018). Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomolecules & Therapeutics*, 26(2), 130.
110. Azuma, M., Le, T. D., Yoshimoto, Y., Hiraki, N., Yamanaka, M., Omura, F., & Inoue, Y. H. (2019). RNA-seq analysis of diet-driven obesity and anti-obesity effects of quercetin glucoside or epigallocatechin gallate in *Drosophila* adults. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(2), 857-876.
111. Ecker, A., do Nascimento Gonzaga, T. K. S., Seeger, R. L., Dos Santos, M. M., Loreto, J. S., Boligon, A. A., ... & Barbosa, N. V. (2017). High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 605-616.
112. Farag, M. R., Abo-Al-Ela, H. G., Alagawany, M., Azzam, M. M., El-Saadony, M. T., Rea, S., ... & Nouh, D. S. (2023). Effect of Quercetin Nanoparticles on Hepatic and Intestinal Enzymes

- and Stress-Related Genes in Nile Tilapia Fish Exposed to Silver Nanoparticles. *Biomedicines*, 11(3), 663.
113. Hull-Thompson, J., Muffat, J., Sanchez, D., Walker, D. W., Benzer, S., Ganformina, M. D., & Jasper, H. (2009). Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS genetics*, 5(4), e1000460.
 114. Salgado-Canales, D., Quenti, D., Lourido, F., Cifuentes, M., & Tobar, N. (2023). Effect of time-restricted feeding on high-fat diet-induced metabolic dysfunction in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 166749.
 115. Pasco, M. Y., & Léopold, P. (2012). High sugar-induced insulin resistance in *Drosophila* relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PloS one*, 7(5), e36583.
 116. Nakitto, A. M. S., Rudloff, S., Borsch, C., & Wagner, A. E. (2021). *Solanum anguivi* Lam. fruit preparations counteract the negative effects of a high-sugar diet on the glucose metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Food & Function*, 12(19), 9238-9247.
 117. Strilbytska, O. M., Zayachkivska, A., Koliada, A., Galeotti, F., Volpi, N., Storey, K. B., ... & Lushchak, O. (2020). Anise Hyssop *Agastache foeniculum* increases lifespan, stress resistance, and metabolism by affecting free radical processes in *Drosophila*. *Frontiers in physiology*, 11, 596729.
 118. Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Wagner, A. E., Stachurska, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., ... & Rimbach, G. (2011). Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(3), 293-299.
 119. Kobori, M., Takahashi, Y., Akimoto, Y., Sakurai, M., Matsunaga, I., Nishimuro, H., ... & Ohnishi-Kameyama, M. (2015). Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. *Journal of Functional Foods*, 15, 551-560.
 120. Lushchak, V., Rovenko, B. M., Gospodaryov, D. V., & Lushchak, V. I. (2011). *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(1), 27-34.
 121. Subramanian, P., Kaliyamoorthy, K., Jayapalan, J. J., Abdul-Rahman, P. S., & Haji Hashim, O. (2017). Influence of quercetin in the temporal regulation of redox homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Science*, 17(2).
 122. Harshavardhana, H. R., & Krishna, M. S. (2019). Protective role of leaf extract on high sucrose diet-induced diabetic *Gymnema sylvestre* like phenotype, oxidative stress, reproductive fitness and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(3), 535-546.
 123. Trindade de Paula, M., Poetini Silva, M. R., Machado Araujo, S., Cardoso Bortolotto, V., Barreto Meichtry, L., Zemolin, A. P. P., ... & Prigol, M. (2016). High-fat diet induces

oxidative stress and MPK2 and HSP83 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

124. Rovenko, B. M., Kubrak, O. I., Gospodaryov, D. V., Perkhulyn, N. V., Yurkevych, I. S., Sanz, A., ... & Lushchak, V. I. (2015). High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 79, 42-54.
125. Jia, E., Yan, Y., Zhou, M., Li, X., Jiang, G., Liu, W., & Zhang, D. (2019). Combined effects of dietary quercetin and resveratrol on growth performance, antioxidant capability and innate immunity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Animal Feed Science and Technology*, 256, 114268.