



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**“Efecto de compuestos bioactivos sobre el fenómeno de polarización de macrófagos bajo hiperglicemia y su potencial participación en enfermedades relacionadas a la inflamación”**

**Tesis**

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos**

**Presenta:**

M. en C. Josué Manríquez Núñez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



**CC BY-NC-ND 4.0 DEED**

**Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional**

**Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

**Bajo los siguientes términos:**

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

**Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Querétaro, Querétaro a 17 de noviembre de 2023.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**“Efecto de compuestos bioactivos sobre el fenómeno de polarización de macrófagos bajo hiperglicemia y su potencial participación en enfermedades relacionadas a la inflamación”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:  
**Doctor en Ciencia de los Alimentos**

**Presenta:**

M. en C. Josué Manríquez Núñez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**SINODALES**

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Presidente

Dra. María Ofelia Mora Izaguirre  
Secretario

Dr. Francesc Villarroya Gombau  
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Suplente

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez  
Suplente

---

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Química

---

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Santiago de Querétaro, Qro., a 17 Noviembre de 2023

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONAHCYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado, como también a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro la que siempre consideraré mi segundo hogar.

Agradezco a mi madre y mi familia por siempre apoyarme e impulsarme a seguir mis metas, por estar y entender lo que conlleva elegir este camino, siempre los llevo conmigo y los quiero a todos.

A la Dra. Minerva Ramos que ha sido mi mentora a lo largo de todo este camino, por confiar en mí todos estos años, por su apoyo brindado tanto para mi desarrollo profesional como personal, le estaré siempre agradecido y tendrá siempre en cuenta sus enseñanzas y sus palabras.

A la Dra. Ofelia Mora por mostrarme una manera diferente de trabajar así como todo el conocimiento compartido; del mismo modo, quiero agradecer a la M. en C. María Laura González Dávalos por todo el apoyo brindado durante mi fase experimental.

Al Dr. Francesc Villarroya le agradezco siempre su disposición y el apoyo que me brindó durante todo este proyecto, fue un gusto haber podido trabajar con usted aunque fuera de manera breve y muchas gracias por todo lo aprendido.

A la Dra. Rosalía Reynoso quien también me conoce de toda la vida prácticamente, le agradezco toda su paciencia y todo lo que me ha enseñado a lo largo de estos años, siempre ha sido un gran ejemplo para mí. También quiero agradecer a la Dra. Iza Pérez por sus observaciones y el apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

También quiero agradecer a mis amigos Patricia Martínez, Adolfo Castañeda, Atalia Reyes, Kristell Rivera, Ximena Ávalos y Laura Muñoz, hemos compartido mucho y me han visto tanto en las buenas como en las muy malas, definitivamente este camino no hubiera sido el mismo y saben que siempre estaré para ustedes. Especialmente quiero agradecer a Ramón Flores y Vanessa Sánchez por brindarme

su amistad y estar siempre para mí, agradezco su confianza, apoyo y todos los momentos que hemos compartido hasta ahora, también saben que cuentan conmigo para lo que sea.

A mis amigos Kamikaze Angel, Lalo y Cristopher con quienes he compartido grandes momentos, ha sido un honor todo este tiempo con ustedes, les agradezco por sus palabras y el apoyo todos estos años.

A la Dra. Flor González por todo su apoyo en mi fase experimental y las experiencias compartidas.

Al final me tomaría otras 90 paginas poder agradecer a todas las personas que fueron parte importante durante estos años, por ejemplo a mi profesor del Kung Fu Eduardo Landa, a mi maestro de batería Martín Ortiz, a Carmelita Campos, a mi compañera de laboratorio Carolina Robles y muchas más personas que me han apoyado, creo que al final lo importante es que no me alcanzan las palabras para poder nombrarlos a todos pero saben que los aprecio y que siempre estaré para ustedes.

Para todos los que decidan tomar este camino de la ciencia para su vida recuerden *“quemar las naves”*.

**Declaración de responsabilidad del estudiante:**

Declaro que los datos propios obtenidos de esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que se reportan detalles necesarios para que los mismos sean reproducibles en futuras investigaciones. Del mismo modo, en el presente manuscrito de tesis se plasma un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

**M. en C. Josué Manríquez Núñez**

## RESUMEN

Actualmente, la investigación se centra en compuestos bioactivos con potencial para promover la polarización de macrófagos con el objetivo de disminuir el desarrollo de enfermedades relacionadas a la inflamación. Sin embargo, el efecto de los compuestos bioactivos bajo hiperglucemia y fructosa sobre la polarización de los macrófagos se encuentra escasamente estudiado. En base a lo anterior, Se incubaron macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar (GE) o alta (HG) en presencia o ausencia de fructosa con estimulación con lipopolisacárido (LPS, 10, 60 y 100 ng/mL), para monitorear la polarización posterior a la incubación con resveratrol (RSV) o 3H-1,2-ditiol-3-tiona (D3T) (2,5, 5, 10 y 20  $\mu$ M). En general, y bajo las diferentes condiciones evaluadas, el RSV disminuyó significativamente la viabilidad de los macrófagos a la concentración más alta (20  $\mu$ M), mientras que el D3T tuvo un efecto bajo o nulo. Igualmente, la estimulación con LPS a 60 y 100 ng/mL, en condiciones GE y HG con y sin fructosa, aumentó significativamente la viabilidad de los macrófagos. Tanto el RSV como el D3T redujeron significativamente la producción de óxido nítrico (NO) en la mayoría de las condiciones evaluadas, presentando la mayor disminución en GE y HG suplementado con fructosa; mientras que, solo el D3T aumentó los niveles de GSH a 100 ng/mL de estimulación con LPS y normalizó los valores de MDA a 60 ng/mL de LPS en condiciones de HG, presentando también el mayor efecto sobre la actividad de la enzima catalasa (CAT) bajo GE suplementada con fructosa. Bajo estimulación con LPS de 60 ng/mL y HG, los ARNm de IL-1 e IL-6 fueron mayores en general. De forma interesante, el RSV presentó una mayor disminución en la expresión relativa de interleucinas pro-inflamatorias; mientras que, el D3T presentó un mejor perfil anti-inflamatorio a través de la expresión de IL-10 bajo las condiciones evaluadas. Finalmente, se presentó un aumento significativo en la eficacia fagocítica, principalmente por los tratamientos con D3T bajo HG con estimulación de LPS y fructosa. En general, nuestros resultados indican que la hiperglucemia juega un papel fundamental sobre la modulación de la inflamación inducida por macrófagos en respuesta a compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** Polarización de macrófagos, hiperglicemia, fructosa, D3T, resveratrol.

## ABSTRACT

Currently, research focuses on bioactive compounds with the potential to promote macrophage polarization with the aim of reducing the development of inflammatory-related diseases. However, the effect of bioactive compounds under hyperglycemia and fructose on macrophage polarization is poorly studied. RAW 264.7 macrophages were incubated under standard (SG) or high glucose (HG) conditions in the presence or absence of fructose stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 10, 60 and 100 ng/mL), to monitor post-incubation polarization with resveratrol (RSV) or 3H-1,2-dithiol-3-thione (D3T) (2.5, 5, 10 and 20  $\mu$ M). As expected, stimulation with LPS at 60 and 100 ng/ml, under SG and HG conditions with and without fructose, significantly increased macrophage viability. On the contrary, under the different conditions evaluated, RSV significantly decreased macrophage viability at the highest concentration (20  $\mu$ M), while D3T had no negative effect on viability. Furthermore, both RSV and D3T significantly reduced NO production in most of the conditions evaluated, showing the greatest decrease under SG and HG conditions supplemented with fructose. Interestingly, only D3T increased GSH levels at LPS 100 ng/mL and normalized MDA values at LPS 60 ng/mL under HG conditions, also showing the greatest effect on CAT activity under SG and fructose supplementation. As expected, the levels of IL-1 and IL-6 mRNAs were higher under stimulation with LPS (60 ng/mL) and HG. Interestingly, RSV exerted a greater decrease on the relative expression of pro-inflammatory interleukins; while, D3T showed a better anti-inflammatory profile (IL-10) under the conditions evaluated. Finally, there was a significant increase in phagocytic efficiency mainly under D3T treatment at HG with LPS stimulation and fructose supplementation. Overall, our results indicate that hyperglycemia plays a critical role over macrophage-induced inflammation /polarization in response to bioactive compounds.

**Keywords:** Macrophage polarization, hyperglycemia, fructose, D3T, resveratrol.

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Homeostasis de los tejidos .....	3
2.2 Homeostasis celular.....	3
2.3 Microambiente celular .....	4
2.4 Metabolismo de carbohidratos.....	4
2.5 Inflamación.....	6
2.6 Hiperglicemia, inflamación y actividad de macrófagos .....	7
2.7 Enfermedades relacionadas a la inflamación.....	10
2.8 Elementos relacionados al fenómeno de polarización de macrófagos .....	12
2.9 Elementos antioxidantes relacionados al fenómeno de polarización de macrófagos .....	15
2.10 Compuestos bioactivos presentes en alimentos.....	16
2.11 Resveratrol (3,4',5-trans-trihidroxi-estilbeno) .....	17
2.12 D3T (3H-1,2-ditiol-3-tiona) .....	17
2.13 Polarización de macrófagos y compuestos bioactivos .....	18
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS .....	22
4.1 Objetivo general .....	22
4.2 Objetivos específicos .....	22
V. METODOLOGÍA.....	23
5.1 Estrategia experimental .....	23
5.2 Cultivo de macrófagos RAW 264.7.....	23
5.3 Tratamientos en macrófagos .....	24
5.4 Viabilidad celular por MTT .....	26
5.5 Determinación de proteína por BCA .....	26
5.6 Producción de ON por reactivo de Griess .....	27
5.7 Detección de MDA por el ensayo de TBARS .....	27
5.8 Cuantificación de GSH total.....	28
5.9 Determinación de la actividad de catalasa (CAT) .....	29

5.10	Determinación de la capacidad fagocítica .....	29
5.11	Aislamiento de RNA y análisis por qPCR .....	30
5.12	Microscopía .....	31
5.13	Ánalisis estadístico.....	31
VI.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		32
6.1	Viabilidad y densidad celular de macrófagos RAW 264.7 bajo glucosa estándar y alta en ausencia o presencia de LPS .....	33
6.2	Cambios en la producción de ON por el efecto de la suplementación de D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 bajo glucosa estándar o glucosa alta con estimulación por LPS....	41
6.3	Efecto del D3T y RSV sobre el estrés oxidativo (GSH y MDA) en macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones estándar y altas de glucosa bajo estímulo de LPS.....	45
6.4	Supresión de la respuesta pro-inflamatoria en la línea celular RAW 264.7 por D3T y RSV en condiciones de hiperglicemia.....	50
6.5	Inducción de la respuesta anti-inflamatoria y marcadores moleculares del fenotipo M2 por D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS en condiciones de hiperglicemia..	54
6.6	Cambios morfológicos mediados por estimulación con LPS bajo glucosa estándar y alta glucosa en macrófagos RAW 264.7 suplementados con D3T y RSV.....	58
6.7	Viabilidad y densidad celular de macrófagos RAW 264.7 bajo hiperglicemia en ausencia o presencia de LPS con suplementación de fructosa .....	61
6.8	Cambios en la producción de ON por el efecto de D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 bajo glucosa estándar o glucosa alta con estimulación por LPS y fructosa .....	64
6.9	Efecto del D3T y RSV sobre la respuesta al estrés oxidativo (GSH y CAT) en macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones de hiperglicemia, estimulación con LPS y suplementación con fructosa	
6.10	66	
6.11	Supresión de la respuesta pro-inflamatoria en la línea celular RAW 264.7 por D3T y RSV en condiciones de hiperglicemia y estimulación con fructosa .....	68
6.12	Inducción de la respuesta anti-inflamatoria y expresión relativa de marcador molecular del fenotipo M2 por D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS en condiciones de hiperglicemia y estimulación con fructosa .....	71
6.13	Cambios en la eficiencia de la fagocitosis mediada por estimulación con LPS bajo hiperglicemia y fructosa en macrófagos RAW 264.7 suplementados con D3T y RSV .....	74
VII.CONCLUSIONES .....		77
VIII.REFERENCIAS .....		79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenómeno de polarización en macrófagos. ....	10
Figura 2. Desarrollo de padecimientos relacionados a la inflamación mediada por macrófagos. ....	12
Figura 3. Estrategia experimental. ....	23
Figura 4. Diagrama experimental general para la determinación de la inducción por RSV y D3T ..	25
Figura 5. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre la viabilidad celular por MTT en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa y LPS. ....	37
Figura 6. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre el contenido de proteína celular total por BCA de la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación alta en glucosa y LPS. ....	40
Figura 7. Efecto de la suplementación con RSV y D3T en la cuantificación de NO en medio celular de la línea RAW 264.7 en condiciones de GE y HG y estimulados con 10, 60 o 100 ng/mL de LPS. ....	44
Figura 8. Efecto de la suplementación con D3T y RSV sobre la concentración intracelular de GSH total en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglicemia y estimulados con 60 o 100 ng/mL de LPS. ....	47
Figura 9. Efecto de la suplementación con D3T y RSV sobre la concentración de MDA en el medio de cultivo de la línea celular RAW 264.7 bajo GE y HG estimulados con LPS. ....	50
Figura 10. Expresión relativa de genes pro-inflamatorios por efecto de la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa y LPS (60 ng/mL). ....	53
Figura 11. Expresión relativa de la citocina anti-inflamatoria IL-10, el biomarcador M1 CYBB y el biomarcador M2 Arg1 después de la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa y LPS (60 ng/mL). ....	57
Figura 12. Efecto de los compuestos bioactivos D3T y RSV sobre la morfología y confluencia de la línea celular RAW 264.7 ....	60
Figura 13. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre la viabilidad celular por MTT en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa, LPS y fructosa. ....	62
Figura 14. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre el contenido de proteína celular total por BCA de la línea celular RAW 264.7 bajo GE y HG bajo estimulación de LPS y fructosa. ....	63
Figura 15. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre la cuantificación de NO en medio celular de la línea RAW 264.7 en condiciones de GE y HG, estimulados 60 ng/mL de LPS y fructosa. ....	65
Figura 16. Efecto de la suplementación con D3T y RSV sobre los niveles intracelulares de GSH total y la actividad de CAT en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglicemia, estimulados con 60 ng/mL de LPS y suplementados con fructosa. ....	67
Figura 17. Expresión relativa de genes pro-inflamatorios por efecto de la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglicemia, LPS (60 ng/mL) y fructosa. ....	70

Figura 18. Expresión relativa de la citocina antiinflamatoria IL-10 y el biomarcador M1 CYBB posterior a la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglicemia, estimulada con LPS (60 ng/mL) y fructosa. ....	73
Figura 19. Cambios en la eficacia de la fagocitosis posterior a la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglicemia, estimulada con LPS (60 ng/mL) y fructosa. ....	76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre los potenciales elementos implicados en los mecanismos que promueven la polarización de macrófagos M1 en M2 en la línea celular de macrófagos RAW 264.7. ....	19
Tabla 2. Secuencias de los iniciadores empleados para el análisis de la expresión relativa de genes relacionados al fenómeno de polarización. ....	30

## I. INTRODUCCIÓN

La inflamación se considera un proceso patológico comprendido clásicamente por condiciones tales como infecciones, lesiones tisulares, autoinmunidad y, en algunos casos, exposición a diversos factores ambientales (Pan *et al.*, 2022). Actualmente, la inflamación puede relacionarse a la pérdida o variación en la homeostasis de tejidos, derivado de cambios importantes en su microambiente; de tal forma que, podemos entender por homeostasis a un estado de equilibrio entre los diferentes sistemas o tejidos del cuerpo; sin la presencia de inflamación (Meizlish *et al.*, 2021). Dicho de otro modo, se puede definir la homeostasis como un conjunto de características cuantificables como lo puede ser la concentración de glucosa (3.5 a 5.5 mM en individuos metabólicamente sanos), las cuales pueden regularse y mantenerse en rangos metabólicamente saludables. El incremento sostenido de la concentración de glucosa y fructosa aumenta su captación vía transportadores de la familia GLUT, lo que genera resistencia a la insulina y desemboca en un aumento de respuesta pro-inflamatoria (Viola *et al.*, 2019), dando paso al desarrollo de patologías como el sobrepeso y la obesidad, las cuales se consideran como las principales enfermedades metabólicas (Li *et al.*, 2019).

El incremento del metabolismo de carbohidratos promueve mecanismos pro-inflamatorios, favoreciendo la migración e infiltración de elementos del sistema inmunológico, como los macrófagos (Mosser y Edwards, 2008), los cuales desempeñan funciones críticas como reguladores de la homeostasis tisular (Li *et al.*, 2018). Los macrófagos pueden adoptar un fenotipo pro-inflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2) (Viola *et al.*, 2019), dependiendo de los estímulos predominantes en su microambiente. Los macrófagos M1 producen citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 e IL-6 y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), elementos que mejoran sus funciones efectoras (Napoli *et al.*, 2013; Engström *et al.*, 2014) por la estimulación de NF-κB. Por otro lado, los macrófagos M2 se caracterizan por promover mecanismos anti-inflamatorios dirigidos a la resolución de la inflamación

y remodelación de tejidos, esto principalmente por la expresión de citocinas como la IL-10 y la enzima arginasa 1 (Arg1) (Yu *et al.*, 2019; Orecchioni *et al.*, 2020).

A la capacidad de los macrófagos para alternar su fenotipo entre M1 y M2 se conoce como polarización de macrófagos. Actualmente, la investigación se centra en los efectos de diferentes compuestos bioactivos incluidos en la dieta, con el objetivo de reducir o prevenir el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles relacionadas a la inflamación. Los compuestos suplementados en este estudio (resveratrol y D3T) se proponen por su capacidad para inducir respuestas antioxidantes/anti-inflamatorias en macrófagos RAW 264.7 al suprimir la actividad de NF-κB principalmente mediante activación de mTOR (resveratrol) (Yu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020), o por la actividad transcripcional de Nrf2 a través de los elementos de respuesta antioxidante en genes de citoprotección (3H-1,2-ditiol-3-tiona) (Kou *et al.*, 2016). Además, la modulación de la actividad de los macrófagos por compuestos bioactivos bajo hiperglicemia, así como diferentes niveles de estimulación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) como inductor del fenotipo M1 se encuentra muy poco estudiado. En este sentido, el desarrollo de enfermedades relacionadas con la inflamación, se favorecen por una serie de anomalías metabólicas derivadas del desequilibrio energético (Pararasa *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016), en las que la polarización de los macrófagos podría contribuir a disminuir la progresión o el desarrollo de las mismas.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Homeostasis de los tejidos

Podemos entender por homeostasis a un estado de equilibrio entre los diferentes sistemas o tejidos del cuerpo necesarios para la supervivencia; en este sentido, se suele entender la homeostasis como un estado fisiológico sin inflamación de los tejidos de un organismo (Meizlish *et al.*, 2021). Así mismo, es posible definir la homeostasis como un conjunto de características cuantificables, las cuales pueden regularse y mantenerse en rangos considerados metabólicamente saludables. Como ejemplo, la concentración de glucosa en circulación ronda de 3.5 a 5.5 mM en individuos metabólicamente sanos (Güemes *et al.*, 2015) y se puede regular por medio de bio-sensores en diversos tipos de células lo que, en conjunto con otros sistemas como el hígado y tejido adiposo, contribuyen a regular la concentración de la misma (Herman y Kahn, 2006).

### 2.2 Homeostasis celular

La homeostasis celular no se encuentra del todo definida, debido a que el enfoque clásico de estudio para modelos celulares se basa principalmente en la respuesta al estrés por parte de las mismas. La homeostasis celular se ha estudiado a través de alteraciones extremas del microambiente celular como puede ser la hiperosmolaridad, la hipoxia, la limitación de nutrientes, la modificación de la temperatura, la eliminación de cofactores, entre otros.

En este sentido, la respuesta general al estrés en los tejidos se da principalmente a través de células capaces de detectar y actuar sobre diversos estímulos (Meizlish *et al.*, 2021); por lo que, la activación de mecanismos anti-inflamatorios y antioxidantes endógenos jugarían un papel fundamental en la homeostasis celular frente al estrés producido por la hiperglicemia donde la concentración de glucosa

en sangre puede sobrepasar una concentración de hasta 22 mM (Güemes *et al.*, 2015).

### **2.3 Microambiente celular**

El término microambiente celular se relaciona ampliamente al desarrollo de tumores, los cuales tienen como característica general una alteración drástica en la homeostasis del tejido (Egeblad *et al.*, 2010; Pal y Thompson, 2017). Estas alteraciones pueden ser detectadas por elementos celulares del sistema inmunológico residentes del tejido como los macrófagos; los cuales, en conjunto con células endoteliales y estromales, colaboran para reestablecer la homeostasis en el tejido afectado, lo que disminuye la progresión de los tumores (Noy y Pollard, 2014).

Además en escenarios de proliferación excesiva como puede presentarse durante la hiperglicemia (Nagy *et al.*, 2019), los mecanismos celulares encargados de promover la homeostasis se ven rebasados lo que deriva en muerte celular, disminución o pérdida de función del tejido y cambios en la arquitectura del mismo (Mantovani *et al.*, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010). Esto último también es fuertemente promovido por el aumento desmedido de los mecanismos pro-inflamatorios del tejido afectado.

### **2.4 Metabolismo de carbohidratos**

Estas alteraciones en la homeostasis, así como las modificaciones en el microambiente celular, pueden ser estudiadas desde la generación de cambios importantes en el metabolismo energético. Tradicionalmente es posible agrupar al metabolismo de un individuo en rutas metabólicas con funciones específicas como las de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, las cuales son fundamentales para la homeostasis energética (DeBerardinis y Thompson, 2012). Si bien,

actualmente gran parte de la investigación sobre el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles se centra en los cambios genéticos y epigenéticos o las alteraciones en las cascadas de señalización, es importante la relación en los cambios metabólicos que pueden estar involucrados en el desarrollo o progresión de diversas patologías.

Como principal ejemplo tenemos a la glucosa, la cual es transportada a todo el organismo a través de diferentes vías; dicho de otra forma, puede almacenarse como glucógeno, generar piruvato por glucólisis o liberarse en sangre por el hígado o los riñones a través de la glucosa-6-fosfatasa. En ayunas, los niveles de glucosa se mantienen estables por las diferencias en la tasa de liberación y utilización de glucosa en el organismo; lo anterior cambia drásticamente al ingerir alimentos, en cuyo caso la tasa de entrega de glucosa exógena puede llegar a ser más del doble de la tasa de producción endógena de la misma, dependiendo del contenido de carbohidratos en los alimentos (Stryer *et al.*, 2013).

El mantenimiento de los niveles de glucosa considerados metabólicamente sanos en humanos depende en gran medida de la respuesta que tienen las células a la insulina, así como una correcta función de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4 (Chen *et al.*, 2019), sin dejar de lado que se requiere un balance entre el gasto metabólico de glucosa, la producción endógena de glucosa y la ingesta de la misma proveniente de la alimentación (Giugliano *et al.*, 2008). Cuando se presenta un incremento sostenido en la ingesta de glucosa, aumenta la captación de glucosa vía transportadores de la familia GLUT lo que normalmente conduce a resistencia a la insulina y desemboca en un aumento de la concentración de glucosa en plasma. En conjunto, lo anterior da paso al desarrollo de patologías como el sobrepeso y obesidad, las cuales se consideran como las principales enfermedades metabólicas (Li *et al.*, 2019).

Estos efectos de las altas concentraciones de glucosa se pueden ver potenciados por altas concentraciones de fructosa en circulación, la cual puede llegar hasta 2

mm (Herman y Birnaum, 2021). De entre los diferentes tipos de azúcares contenidos en alimentos, se ha encontrado que la fructosa es un elemento importante en la progresión del síndrome metabólico. La fructosa es metabolizada a piruvato en una tasa mucho más alta que la propia glucosa para posteriormente ser empleada en la síntesis de lípidos y gluconeogénesis (Iizuka, 2023), lo cual aumenta significativamente la probabilidad de padecer de sobrepeso u obesidad, así como las comorbilidades asociadas. Estudios recientes apuntan a que la mayor parte de la fructosa que entra por vena porta es metabolizada en el intestino a través del transportador GLUT5 (Jung *et al.*, 2022) que, al ser independiente de insulina, incrementa el metabolismo de fructosa en comparación al de glucosa, por lo que sus niveles detectables en sangre suelen ser mucho menores a los de glucosa (Iizuka, 2023). Estos incrementos en el metabolismo de carbohidratos como de lípidos se relacionan a su vez con la estimulación de los mecanismos pro-inflamatorios del tejido afectado.

## 2.5 Inflamación

Actualmente se reconoce a los procesos inflamatorios como la base común en el desarrollo y progresión de una amplia variedad de patologías como las enfermedades autoinmunes, las enfermedades metabólicas, el cáncer, entre otras enfermedades crónicas. En este sentido, se suele reconocer tradicionalmente a la inflamación como un proceso patológico el cual se induce en respuesta a factores ambientales, infección por patógenos, daño del tejido y reacciones auto-inmunes (Pan *et al.* 2022).

Tanto el aumento de la temperatura corporal, el dolor focalizado o sistémico, la sudoración, el enrojecimiento de zonas afectadas y, principalmente, la infiltración de elementos celulares del sistema inmunitario, son algunas de las características de la progresión de los mecanismos pro-inflamatorios (Rathinam y Chan, 2018; Meizlish *et al.*, 2021). La inflamación tiene un papel clave en el mantenimiento de la

homeostasis de los tejidos; dicho de otro modo, después de activarse la respuesta inflamatoria tanto los elementos de la respuesta inmunitaria innata como adaptativa se enfocan en la resolución de los focos inflamatorios promoviendo la restauración del tejido. Por otra parte, si estos procesos no se regulan de manera adecuada los mismos persisten generando inflamación crónica y, eventualmente, la progresión de enfermedades crónicas (Nathan y Ding, 2010; Shi *et al.*, 2018).

Los macrófagos se encuentran en prácticamente cualquier tejido del organismo y son los principales orquestadores de la respuesta inflamatoria; dentro de sus principales funciones como elementos del sistema inmunitario innato está la liberación de citocinas y la fagocitosis (Diskin y McDermott, 2018). Estas células son activadas de manera clásica por lipopolisacáridos presentes en la membrana de microorganismos (LPS) a través del receptor tipo toll 4 (TRL4), o por estímulos procedentes tanto de tejidos afectados por medio de la liberación de citocinas [interferón gama (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], como también por otros elementos del sistema inmunitario como los linfocitos Th1. En este estado de activación, los macrófagos tienen una mejor funcionalidad contra los patógenos y las células tumorales, siendo regulados por macrófagos anti-inflamatorios para prevenir la persistencia de los focos de inflamación crónica (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

## 2.6 Hiperglicemia, inflamación y actividad de macrófagos

Al persistir las condiciones de hiperglicemia se promueve un aumento del metabolismo de carbohidratos, la síntesis *de novo* de ácidos grasos y los mecanismos pro-inflamatorio, lo cual alterar la función efectora de los macrófagos (Kolliniati *et al.*, 2022). De manera interesante, los macrófagos se clasifican como células glucolíticas primordialmente, debido a la necesidad de los macrófagos de una rápida activación de sus funciones efectoras (Zhu *et al.*, 2014). Al activarse las señales pro-inflamatorias, tales como la proteína quimioatractante de mocitos (MCP-

1) o la IL-1 en el tejido afectado, los monocitos en circulación se infiltran en el tejido para madurar en macrófagos residentes donde, dependiendo del microambiente, adoptarán un fenotipo pro-inflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2) (Viola *et al.*, 2019).

Estos fenotipos en los macrófagos se aceptan como transitorios, reversibles y con la capacidad de ser modulados por una gran variedad de estímulos. Los macrófagos M1 se definen como "activados por la vía clásica" con la función principal de combatir patógenos, principalmente por mecanismos de fagocitosis (Hotamisligil, 2006; Diskin y McDermott, 2018). Los macrófagos M1 expresan tanto enzimas como el citocromo b-245 (CYBB) como también citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 e IL-6 y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), elementos que en conjunto mejoran sus funciones efectoras (Napoli *et al.*, 2013; Engström *et al.*, 2014; Gerrick *et al.*, 2018). Por su parte, los macrófagos M2 se definen como un fenotipo "activado alternativamente" cuya principal función es la actividad anti-inflamatoria que promueve la resolución de la inflamación, la remodelación de tejidos (homeostasis de tejido) y la cicatrización de heridas a través de la expresión de citocinas como la IL-10 y la enzima arginasa 1 (Arg1) (Yu *et al.*, 2019; Orecchioni *et al.*, 2020), entre otros.

A la capacidad de los macrófagos para alternar su fenotipo entre M1 y M2 se le conoce como polarización. Esta capacidad de alternar entre fenotipos puede inducirse a través de la suplementación de compuestos bioactivos. Por ejemplo, Kang y colaboradores evaluaron el efecto de la Brassinina (fitoalexina procedente de crucíferas) en un sistema de co-cultivo macrófago-adipocito, donde la suplementación con este compuesto bioactivo redujo significativamente la acumulación de lípidos en los adipocitos y la expresión de interleucinas pro-inflamatorias (IL-6) por parte de los macrófagos, lo cual sugiere que dicho compuesto podría inhibir la inflamación inducida por la obesidad (Kang *et al.*, 2019).

En los últimos años se han propuesto a los principales factores de transcripción implicados en el fenómeno de polarización. Por una parte, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF-κB) es el principal factor relacionado con la activación y actividad de macrófagos M1, el cual promueve la transcripción de diversas proteínas pro-inflamatorias. Así mismo, el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) se ha propuesto como un elemento molecular importante implicado en la actividad de macrófagos M2, debido a su capacidad para neutralizar el estrés oxidativo al activar los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en las células, lo que se vincula con una disminución o inhibición de los procesos pro-inflamatorios regulados por NF-κB, potenciando así la actividad de los macrófagos M2 (Tanase *et al.*, 2022).

De manera interesante, ambos factores de transcripción están vinculados a la proteína represora de asociación ECH tipo kelch 1 (Keap1), que podría estar funcionando como un sensor tipo pivote para la regulación de ambas proteínas (Kopacz *et al.*, 2020). Debido a la variedad de elementos moleculares, el potencial impacto de los compuestos bioactivos y las variaciones en el microambiente (concentración de carbohidratos) sobre la polarización de los macrófagos, este fenómeno sigue sin quedar definido (Figura 1).

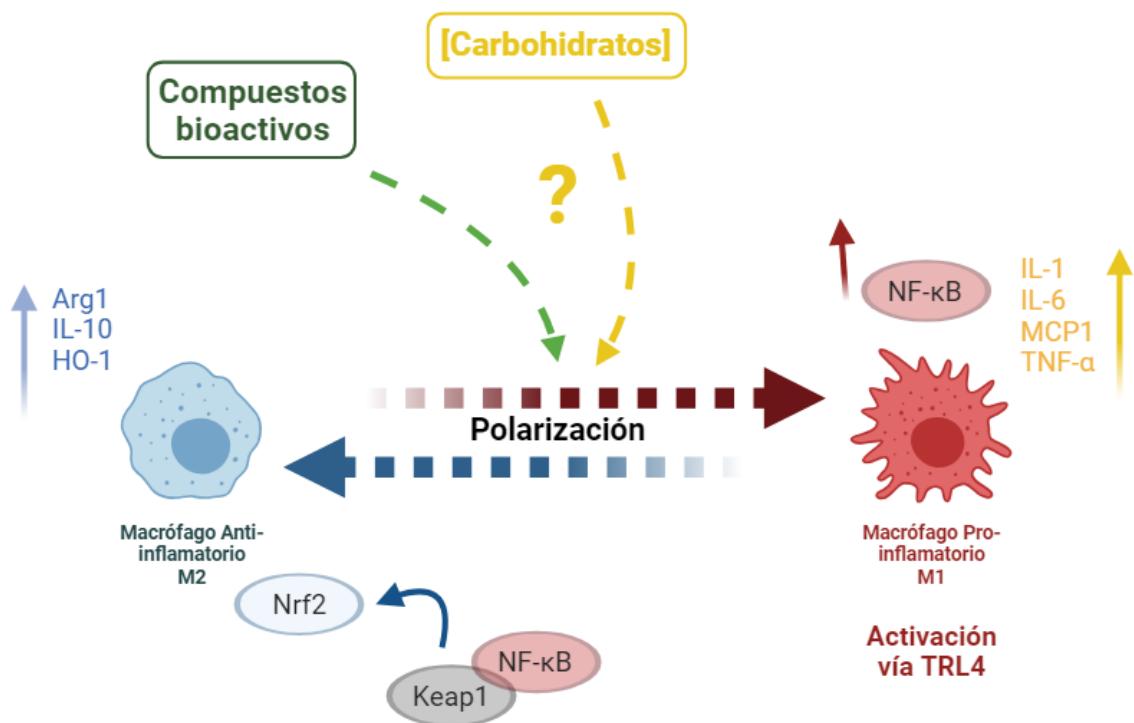


Figura 1. Fenómeno de polarización en macrófagos. El fenómeno de polarización se relaciona a los factores de transcripción Nrf2 y NF-κB. Dependiendo de los estímulos o variaciones en el microambiente, la proteína inhibidora Keap1 funge como un regulador que limita la actividad de Nrf2 o NF-κB. Al favorecerse la actividad de Nrf2, los macrófagos se polarizan a M2; mientras que, si Nrf2 se ve inhibido se promueve la actividad de NF-κB dando como resultado una polarización a M1.

## 2.7 Enfermedades relacionadas a la inflamación

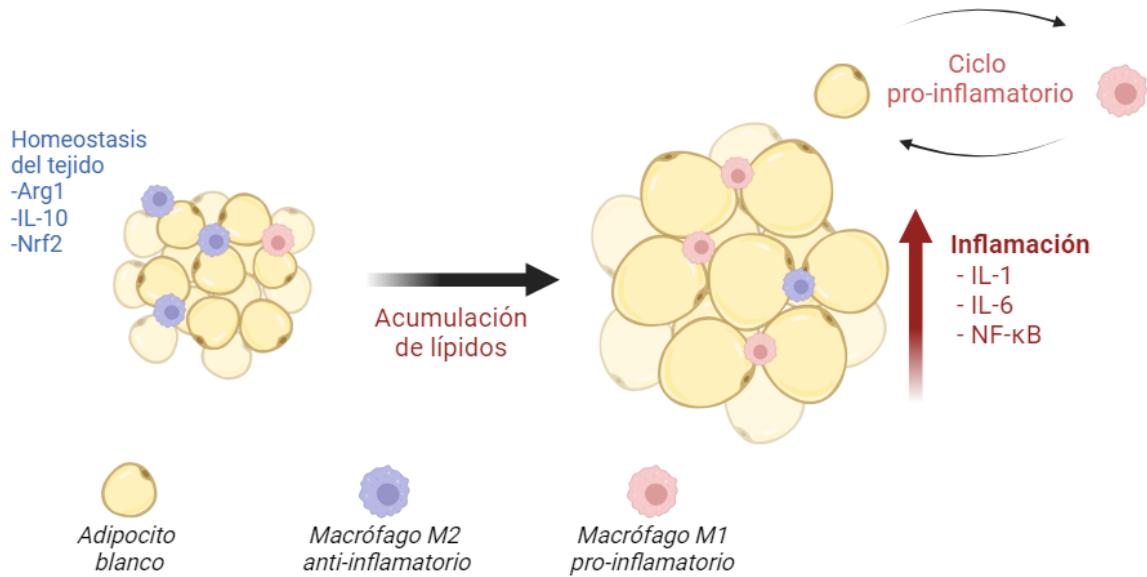
De manera general, los procesos pro-inflamatorios están dirigidos a restaurar la homeostasis, lo cual pareciera claro en términos de neutralización de patógenos. Sin embargo, esta neutralización modifica el tejido en cuestión debido a procesos

como el reclutamiento de monocitos y granulocitos, además de la liberación de elementos pro-inflamatorios los cuales alteran el microambiente (Medzhitov, 2008).

En este sentido, muchas de las enfermedades relacionadas a la inflamación tienen en común que la progresión o activación de los procesos pro-inflamatorios tienden a anular o invalidar a los mecanismos de homeostasis (Zhou *et al.*, 2018); por lo cual, se entendería que el aumento de la inflamación podría tener prioridad sobre los mecanismos homeostáticos por sobre la pérdida transitoria de la misma (Meizlish *et al.*, 2021).

Diversos desórdenes metabólicos, como el sobrepeso y la obesidad, presentan de manera importante interrupciones en estos rangos homeostáticos en el tejido adiposo, principalmente derivados de picos hiperglucémicos los cuales se sabe disparan los mecanismos pro-inflamatorios y, a su vez, aumentan el estrés oxidativo (Figura 2) (Varela *et al.*, 2018; Kawai *et al.*, 2021).

Si bien el sobrepeso y la obesidad representan en la actualidad un problema de salud importante a nivel mundial, también incrementan el desarrollo de otras patologías como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, la inflamación crónica en riñón, los diversos tipos de cáncer, la apnea del sueño, la osteoartritis y, en algunos casos, la depresión (Inflamación en sistema nervioso) (Studentsova *et al.*, 2018; Lin y Li, 2021); las cuales, en general, son enfermedades relacionadas con el aumento descontrolado de los procesos pro-inflamatorios.



*Figura 2. Desarrollo de padecimientos relacionados a la inflamación mediada por macrófagos. Cuando el tejido adiposo se encuentra en homeostasis energética se promueve la liberación de citocinas anti-inflamatorias por parte de los macrófagos residentes M2. Sin embargo, al haber una acumulación excesiva de lípidos derivada de una alta concentración de carbohidratos, ambos adipocitos y macrófagos residentes M1 liberan citocinas pro-inflamatorias las cuales afectan la función del tejido adiposo promoviendo el desarrollo de sobrepeso y obesidad.*

## 2.8 Elementos relacionados al fenómeno de polarización de macrófagos

Los cambios en el fenotipo de los macrófagos modifican el tipo y la cantidad de citocinas que se liberan al microambiente del tejido, lo que a su vez altera el metabolismo del tejido, regulando los procesos pro-inflamatorios. A continuación, se enlistan las principales citocinas, así como los marcadores moleculares que intervienen en la plasticidad de los macrófagos:

- **Arg1:** La enzima arginasa 1 metaboliza la L-arginina en urea y L-ornitina contribuyendo a la síntesis de prolina y poliaminas. Estos elementos se

identifican como críticos tanto para los mecanismos de proliferación celular como para la síntesis de colágeno, lo que contribuye significativamente a la remodelación del tejido y la disminución de la cascada pro-inflamatoria. La inducción de Arg1 se relaciona a la actividad anti-inflamatoria de macrófagos M2 (Gentles *et al.*, 2015; Arlauckas *et al.*, 2018).

- **CYBB:** El citocromo b-245 codifica para la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa, la cual es responsable del aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) fundamental para la función efectora de macrófagos M1 (Gerrick *et al.*, 2018).
- **IL-1:** Identificada en macrófagos y otros elementos del sistema inmunitario, tiene funciones pro-inflamatorias, inmunomoduladoras y además interviene en el proceso de glucólisis en diferentes tejidos (Tan *et al.*, 2018).
- **IL-6:** Secretada por macrófagos y otras células, ha mostrado afectar de manera negativa la sensibilidad a la insulina de manera similar a TNF- $\alpha$  (Rotter *et al.*, 2003). Estudios recientes han mostrado que esta citocina promueve la lipólisis en tejido adiposo limitando el proceso de adipogénesis (Hu *et al.*, 2019).
- **IL-10:** Secretada por diferentes células del sistema inmunitario (entre ellas los macrófagos), genera una respuesta anti-inflamatoria al suprimir la síntesis de TNF- $\alpha$  por los mismos macrófagos y células vecinas. En adipocitos, esta citocina contribuye a mejorar la sensibilidad a la insulina (Rajasingh *et al.*, 2006); sin embargo, la deficiencia de la misma aparentemente no promueve la inflamación en el tejido adiposo, por lo que su papel en la modulación de la inflamación aún está sin esclarecerse.

- **Keap1:** Descubierto en 1999 por un ensayo de selección (Itoh *et al.*, 1999), se identificó como una proteína que reprime la actividad transcripcional de Nrf2, sensible a los electrófilos y un sensor intracelular de especies oxidantes (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017). Keap1 es una proteína bien conservada, que comparte alrededor del 95% de homología de secuencia entre especies; lo que es más importante, posee la misma función en todo el árbol filogenético entre los vertebrados (Kopacz *et al.*, 2020). Keap1 promueve la degradación de Nrf2 en condiciones no estresantes; mientras que, los estímulos redox modifican directamente los tioles en Keap1, lo que lleva a la inactivación de su función, la estabilización de Nrf2 y la consiguiente inducción de genes citoprotectores (Yamamoto *et al.*, 2018).
- **NF-κB:** Representa una familia de factores de transcripción inducibles, los cuales regulan la transcripción de varias citocinas pro-inflamatorias en la progresión de la inmunidad innata y adaptativa a diferentes niveles (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). En adipocitos, este factor promueve mecanismos pro-inflamatorios, así como la resistencia a la insulina (Zhang *et al.*, 2018).
- **Nrf2:** Regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, así como del metabolismo de lípidos, mediante su unión a una secuencia conservada específica en el ADN conocida como ARE (Elementos de Respuesta Antioxidante, por sus siglas en inglés) (Cuadrado *et al.* 2018). La translocación de Nrf2 al núcleo para la activación de ARE puede deberse a diversos factores, así como por compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química diversa. Nrf2 también se ha identificado como un regulador esencial del metabolismo intermediario de lípidos a través de la síntesis, el transporte de lípidos y la oxidación de AG (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014). La actividad de Nrf2 está constitutivamente reprimida debido a su unión con la proteína Keap1 (Tong *et al.*, 2007). Se ha sugerido que el

sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación crónica (Qiu *et al.*, 2016).

## **2.9 Elementos antioxidantes relacionados al fenómeno de polarización de macrófagos**

Una característica de la sobre activación de los procesos pro-inflamatorios es un aumento en la generación de ERO, principalmente por actividad mitocondrial, lo que se conoce como estallido respiratorio en los macrófagos (Coussens y Werb, 2002; Hussain *et al.*, 2003). Además, una consecuencia de la generación excesiva de las ERO es un aumento en las moléculas indicadoras de inflamación como lo es el óxido nítrico (ON) y el malonaldehído (MDA), producto de la peroxidación de lípidos.

En condiciones metabólicamente saludables (homeostasis de tejido), existe un balance entre la concentración de ERO y los sistemas antioxidantes endógenos; sin embargo, al presentarse un desequilibrio en ambos se da paso al daño celular derivado de este aumento en el estrés oxidativo a nivel de DNA, proteínas y otras macromoléculas, contribuyendo de esta forma a la progresión de enfermedades relacionadas a la inflamación (Arulselvan *et al.*, 2016). Algunos de los elementos de respuesta antioxidante que pudieran verse afectados por la hiperglicemia se describen a continuación:

- **CAT:** La catalasa es una enzima clave en el metabolismo del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) así como de especies reactivas de nitrógeno (ERN); estos mecanismos de reacción son de los primeros identificados sobre enzimas antioxidantes (Glorieux y Calderon, 2017). La expresión de CAT se encuentra parcialmente regulada vía Nrf2; sin embargo, actualmente se sabe que puede ser inducida por vías alternativas dependiendo de las variaciones en el microambiente celular (Menegon *et al.*, 2016).

- **GSH:** El glutatión es la molécula tiol no proteica más abundante en tejidos de mamíferos; dentro de sus funciones se incluyen el mitigar el estrés oxidativo derivado de la peroxidación lipídica, las ERO, las ERN y diversos xenobióticos. La síntesis de GSH requiere de tres aminoácidos como precursores (cisteína, glutamato y glicina), los cuales se combinan para formar el tri-péptido GSH en el citosol por medio de las enzimas glutamato-cistein ligasa (GCL) y la glutatión sintetasa (GC); además, esta síntesis puede inducirse en respuesta a la activación de Nrf2 (Kennedy *et al.*, 2020).

## 2.10 Compuestos bioactivos presentes en alimentos

Algunas propiedades nutracéuticas de diversas fuentes alimentarias (Frutas, verduras, tisanas o té, cereales y especias, principalmente) se atribuyen al contenido de diferentes compuestos bioactivos en éstos. Los flavonoides son la clase predominante de compuestos fenólicos llegando a representar hasta el 60 % de los fenoles consumidos en la dieta humana (Hagerman, 1998; Robbins, 2003; Mohammadi *et al.*, 2019).

La investigación referente a las propiedades nutracéuticas de diferentes compuestos de fuentes vegetales incluidas en la dieta es importante para poder identificar y ofrecer información precisa de los mecanismos sobre los que podrían estar actuando, las dosis con potencial nutracéutico de consumo, así como también un posible potencial citotóxico. Los compuestos que a continuación se detallan, se proponen como potenciales moduladores de la actividad de macrófagos por su capacidad de activar una respuesta antioxidante a nivel celular al suprimir la actividad de NF-κB parcialmente por la activación de mTORC1 (RSV) (Yu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020), así como favorecer la actividad de Nrf2 (D3T) (Kuo *et al.*, 2016). La evidencia científica sugiere que la suplementación de estos compuestos bioactivos puede contribuir a la polarización de macrófagos M2 bajo condiciones de

hiperglicemia, lo cual potenciaría los mecanismos de homeostasis celular y, por ende, la homeostasis del tejido.

## **2.11 Resveratrol (3,4',5-trans-trihidroxi-estilbeno)**

El resveratrol (RSV) es un compuesto fenólico presente en una gran variedad de plantas; se produce por la acción de la resveratrol sintetasa cuando la planta se encuentra bajo estrés por el ataque de hongos o bacterias (Huang *et al.*, 2019). Se han reportado diversos efectos del RSV como la actividad antioxidante, anti-inflamatoria, anti-cáncerígena, anti-envejecimiento, anti-diabética y neuroprotectora (Poulsen *et al.*, 2013).

Del mismo modo se han reportado efectos positivos del RSV sobre los mecanismos de termogénesis en el tejido adiposo, ya que el RSV reduce la acumulación de grasa, aumenta el consumo de oxígeno y la expresión de marcadores de termogénesis (Andrade *et al.*, 2014). Estas características podrían estar relacionadas a la capacidad del RSV de mimetizar un estado de restricción calórica (Chung *et al.*, 2012), lo cual contribuiría a la disminución de padecimientos relacionados a la inflamación.

## **2.12 D3T (3H-1,2-ditiol-3-tiona)**

D3T es el miembro más simple de la familia de dietiltionas que contienen azufre; se puede encontrar principalmente en crucíferas y se ha reportado como un potente inductor de la transcripción de genes antioxidantes por su capacidad de activación de Nrf2 (Kuo *et al.*, 2016).

En la literatura son escasos los estudios sobre los blancos moleculares y los efectos que son inducidos por el D3T; sin embargo, se ha presentado evidencia de compuestos similares, los cuales tienen la capacidad de activar mecanismos

moleculares a través de grupos sulfhidrilo. El HA-ADT, conjugado de ácido hialurónico con la molécula 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tiona, inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama al inhibir la actividad de la proteína diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (Dong *et al.*, 2019). Otro ejemplo es el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), el cual se ha observado que tiene efectos moduladores sobre los mecanismos de inflamación, la apoptosis, la resistencia a la insulina, la secreción de citocinas y la diferenciación de adipocitos por la inhibición del factor NF- $\kappa B$  (Zhu *et al.*, 2020).

Las diferentes respuestas celulares que puede promover D3T a través de la inducción de mecanismos antioxidantes por la activación de Nrf2 u otros factores de transcripción continúan en estudio; su efecto en la polarización de macrófagos bajo diversos escenarios de estrés aún permanece sin determinarse.

## **2.13 Polarización de macrófagos y compuestos bioactivos**

El fenómeno de polarización en macrófagos vía Nrf2/Keap1/NF- $\kappa B$  es uno de los planteamientos para explicar este cambio de fenotipo; no obstante, a pesar de identificarse a estos genes como los principales promotores (Farruggia *et al.*, 2018), el cómo se consigue la modulación permanece sin respuesta; por lo cual, diversos grupos de trabajo se han enfocado en la identificación de compuestos bioactivos capaces de influir en el fenómeno de polarización (Tabla 1).

A pesar de que los procesos inflamatorios tanto de bajo grado como crónicos son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, el cómo los mecanismos de remodelación se ven afectados también permanecen poco estudiados, debido a que la problemática detrás sugiere ser multifactorial en cuanto a estímulos y mecanismos que interaccionan de manera “negativa” (Villarroya *et al.*, 2018).

*Tabla 1. Estudios sobre los potenciales elementos implicados en los mecanismos que promueven la polarización de macrófagos M1 en M2 en la línea celular de macrófagos RAW 264.7.*

Compuesto	Blanco molecular	Autores
<b>Extracto de <i>Sutherlandia frutescens</i></b>	Disminuye la actividad de MAPK/NF-κB y la transcripción de IL-1 e IL-6.	Camille y Dealtry. (2018)
<b>Astaxantina</b>	Inhibe la translocación de NF-κB, disminuye la expresión de IL-1 e IL-6.	Farruggia <i>et al.</i> (2018)
<b>Fenilpropano glucósido</b>	Promueve la actividad de AMPK y PPAR $\gamma$ .	Wang <i>et al.</i> (2018)
<b>Cúrcuma</b>	Inhibe la activación de MAPK y la translocación de NF-κB.	Mohammadi <i>et al.</i> (2019)
<b>Quercetina</b>	Incrementa la expresión de IL-10 y promueve la activación de AMPK.	Zhu <i>et al.</i> (2019)
<b>Oleiletanolamida</b>	Promueve la actividad de AMPK y PPAR $\gamma$ .	Chen <i>et al.</i> (2020)
<b>Xantoplanina</b>	Limita la actividad del factor de transcripción STAT5 disminuyendo la expresión de IL-1 e IL-6 y aumentando la transcripción de IL-10.	Shi <i>et al.</i> (2020)
<b>Polisacárido de manzana</b>	Inhibición de TLR4 y aumento de la expresión de IL-4 e IL-10.	Sun <i>et al.</i> (2020)

En resumen, se asume que los fenotipos de macrófagos M2 derivados de la suplementación con diversos compuestos bioactivos confieren las mismas características efectoras sobre la resolución de la inflamación; sin embargo, el fenómeno de polarización se ve afectado por alteraciones importantes en la concentración y tipo de azúcares, la intensidad del estímulo pro-inflamatorio y las

características de los compuestos bioactivos (concentración y blanco molecular). Lo anterior genera un importante campo de investigación sobre los efectos de estos factores sobre la polarización de macrófagos como alternativa a la prevención y tratamiento de diversas enfermedades relacionadas a la inflamación.

### **III. HIPÓTESIS**

El fenómeno de polarización de macrófagos está influenciado por diversos estímulos como lo es la hiperglicemia, los estímulos pro-inflamatorios y los compuestos bioactivos provenientes de la dieta; al modificarse los elementos en el microambiente celular, se pueden obtener diferentes tipos de macrófagos M1 y M2. Estos subconjuntos de macrófagos M2 podrían contribuir a la disminución de la progresión de enfermedades relacionadas a la inflamación.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Determinar la influencia de cambios en el microambiente tales como la concentración y el tipo de azúcares, los estímulos pro-inflamatorios y la suplementación de compuestos bioactivos como RSV y D3T en el fenómeno de polarización en macrófagos RAW 264.7 empleando técnicas *in vitro*, bioquímica y biología molecular.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar la inducción de la polarización de macrófagos M1 estimulados con LPS hacia M2 con la suplementación con los compuestos bioactivos RSV y D3T en condiciones estándar de cultivo en la línea celular RAW 264.7.
- Determinar el cambio en la inducción de la polarización de macrófagos M1 estimulados con LPS hacia M2 con la suplementación con RSV y D3T bajo condiciones de alta glucosa en la línea celular RAW 264.7.
- Determinar el cambio de los subconjuntos obtenidos en la inducción de la polarización de macrófagos M1 por RSV y D3T, bajo suplementación de fructosa en condiciones de cultivo estándar y alta glucosa en la línea celular RAW 264.7.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Estrategia experimental

Para alcanzar los objetivos del proyecto se siguió una estrategia experimental en tres etapas (Figura 3). El primer bloque de evaluaciones se dirigió a contestar el primer objetivo; al terminar se realizó el análisis de datos correspondiente a manera de que estos resultados contribuyeran a las etapas posteriores. Este esquema se repitió para la segunda y tercera etapa, en la cual se realizó la integración de resultados de todas las etapas.

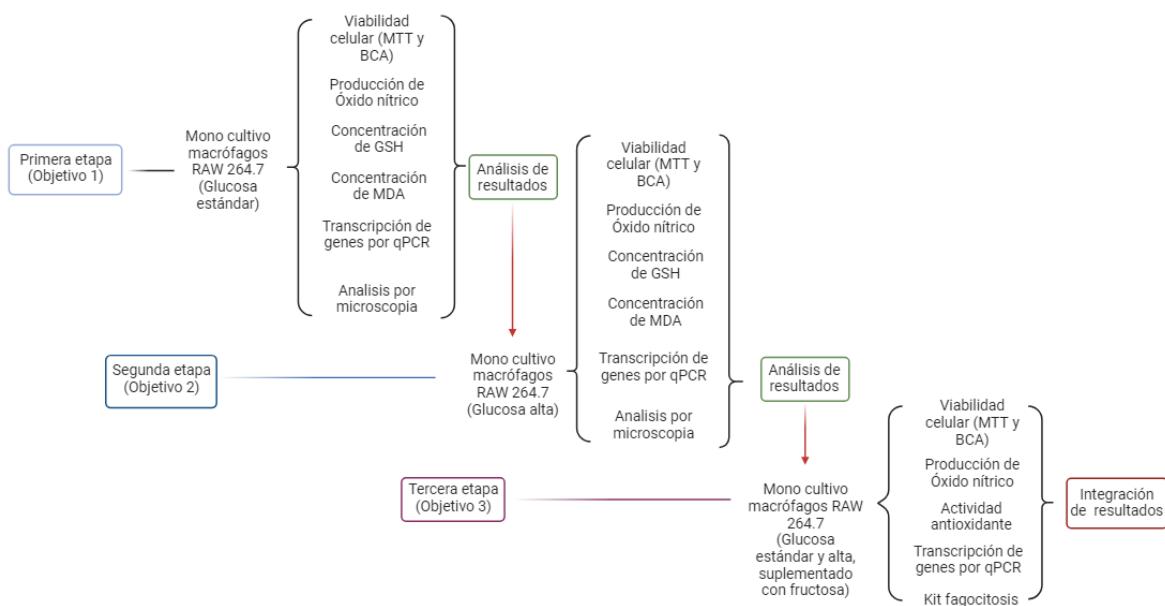


Figura 3. Estrategia experimental. Se ilustra el bloque de experimentos correspondiente a cada objetivo de manera que los análisis de resultados contribuyan a la siguiente etapa.

### 5.2 Cultivo de macrófagos RAW 264.7

Las células RAW 264.7 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA.). Las células RAW264.7 se mantuvieron en condiciones estándar en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) a una concentración de glucosa de 5 mM. Las células se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los diferentes medios empleados consisten de lo siguiente:

- **Medio de mantenimiento celular:** Medio DMEM con diferente concentración de glucosa (5 o 25 mM) con o sin fructosa (2 mM).
- **Medio de activación celular:** Medio DMEM con diferente concentración de glucosa (5 o 25 mM), con estimulación de LPS (10, 60 o 100 ng/mL) y suplementado con o sin fructosa (2 mM).
- **Medio con estimulación de compuestos bioactivos:** Medio DMEM con diferente concentración de glucosa (5 o 25 mM), con o sin estimulación de LPS (10, 60 o 100 ng/mL), diferente concentración de RSV o D3T (2.5, 5, 10 y 20 µM) y suplementado con o sin fructosa (2 mM).

### 5.3 Tratamientos en macrófagos

Para las diferentes determinaciones indicadas en la estrategia experimental asociadas al fenómeno de polarización se empleó un modelo factorial completamente aleatorizado, con tres experimentos independientes por tratamiento de compuestos bioactivos a diferentes concentraciones (2.5, 5, 10 y 20 µM de RSV o D3T) (n = 3), así como controles sin compuestos bioactivos ni estimulación pro-inflamatoria (LPS) y un control positivo de macrófagos M1 (estimulación con 10, 60 o 100 ng/mL de LPS).

Se sembró la cantidad inicial de macrófagos en medio de mantenimiento correspondiente hasta llegar a confluencia de aproximadamente el 80 %; posteriormente, las células se incubaron en el tratamiento correspondiente por 24 h. Concluido este periodo se retiraron los tratamientos y se realizaron las determinaciones correspondientes de MTT, BCA, ON, MDA, CAT y GSH para los diversos bloques experimentales. Al concluir las evaluaciones, se analizó por qPCR la expresión relativa de los genes IL-1, IL-6, IL-10, CYBB y Arg1.

Para la aplicación de los tratamientos, las células se sembraron principalmente en placas de 96 pozos a una densidad celular inicial de  $2.5 \times 10^4$  células y en placas tipo Petri de 60 mm a una densidad inicial de  $6 \times 10^4$  células. La estrategia general para la evaluación de los mecanismos en mono-cultivo de macrófagos se muestra en la Figura 4.

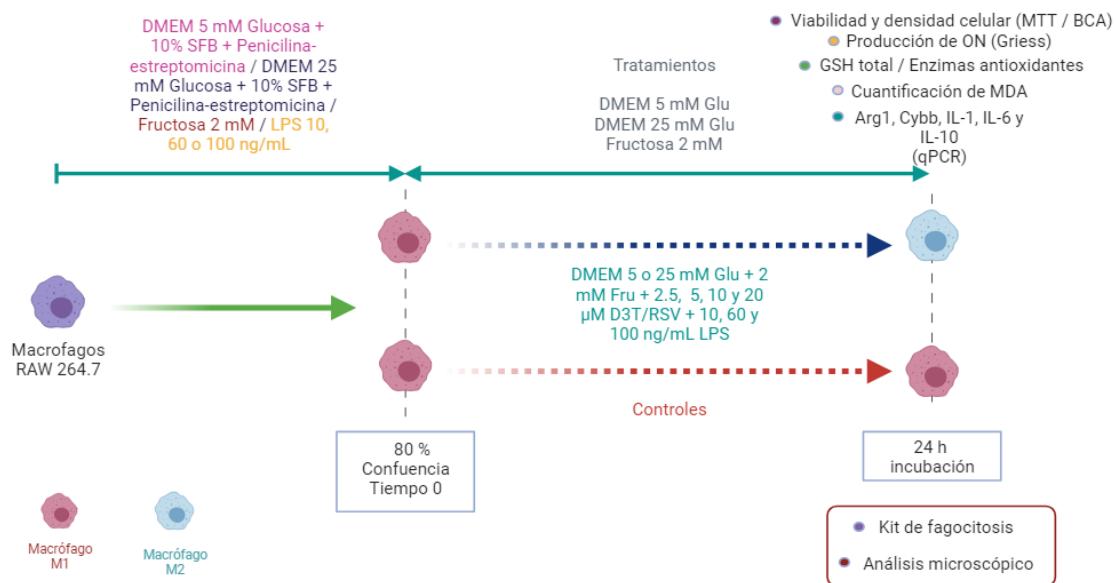


Figura 4. Diagrama experimental general para la determinación de la inducción por RSV y D3T sobre los mecanismos polarización en mono-cultivo de macrófagos.

#### **5.4 Viabilidad celular por MTT**

La prueba de la viabilidad celular sirve para determinar los intervalos de concentración en que pudiera presentarse citotoxicidad por los diferentes tratamientos. La prueba se realizó en placas de 96 pozos con una concentración celular inicial de  $2.5 \times 10^4$  células en 200  $\mu\text{L}$  de medio de mantenimiento por pozo.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT), basado en la reducción metabólica del reactivo realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul oscuro llamado formazán. Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas; la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Vistica *et al.*, 1991).

Posterior a las 24 h de incubación con los diferentes tratamientos, se aspiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS 1x a 37 °C. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de medio estándar y 100  $\mu\text{L}$  de MTT (previa preparación). Las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 2 h. Posteriormente, se retiró el medio y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Una vez homogenizados los pozos se tomó lectura de la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro de placas Varioskan (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). La viabilidad se expresó como porcentaje de cada tratamiento relativo al control de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **5.5 Determinación de proteína por BCA**

El ensayo permite determinar la concentración de proteína por la reducción del Cu<sup>2+</sup> en una solución de ácido bicinconílico (BCA). El ensayo se dirige a cuantificar las variaciones de la concentración de proteínas resultado de la densidad celular por efecto de los tratamientos administrados.

La prueba se realizó en placas de 96 pozos con una concentración celular de  $2.5 \times 10^4$  células en 200  $\mu\text{L}$  de medio de mantenimiento por pozo, posterior a las 24 h de incubación con el tratamiento correspondiente. Finalizada la incubación se procedió a seguir el protocolo del kit Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay de ThermoFisher Scientific. El contenido de proteína total se expresó por extrapolación con curva de calibración de albumina (0 a 2000 mg/mL).

## 5.6 Producción de ON por reactivo de Griess

La formación de ON se detectó por la acumulación de nitritos en el medio de cultivo, para lo cual los macrófagos se sembraron en placa de 96 pozos a una concentración inicial de  $2.5 \times 10^4$  células. Posterior a las 24 h de incubación con los respectivos tratamientos, se cuantificó la concentración de nitritos ( $\text{NO}_2$ ) en el medio empleando el reactivo de Griess. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo de cada tratamiento y se colocó en una placa de 96 pozos nueva para a continuación seguir el protocolo:

- Se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5% a la muestra y se incubó por 5 min protegido de la luz.
- Posteriormente se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de N-1naftiletilendiamina (NED) en ácido fosfórico al 5 % y se incubó por 30 min protegido de la luz.
- Al finalizar la incubación se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 540 nm en un lector de placas.

La concentración de nitritos se expresa por extrapolación con una curva de calibración realizada previamente empleando nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) en un rango de 0 a 1000  $\mu\text{M}$  (Rada *et al.*, 2003).

## 5.7 Detección de MDA por el ensayo de TBARS

El ensayo de TBARS se utiliza ampliamente para la determinación de la peroxidación lipídica en muestras biológicas como indicador de estrés oxidativo (De

León y Borges, 2020). Posterior a las 24 h de incubación con los tratamientos, se preparó el reactivo previo al análisis de las muestras, el cual está compuesto por 15 % de ácido tricloroacético, 0.375 % de ácido tiobarbitúrico y 2.1 % de ácido clorhídrico (V/V/V) en agua destilada. La reacción se preparó con una parte de la muestra en 5 partes de reactivo TBARS; posteriormente, las muestras se colocaron en un baño de ultrasonido con agua destilada a 90 °C durante 20 min. Una vez finalizado el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. Al finalizar se recuperaron 270 µL de sobrenadante y se colocaron en una placa de 96 pozo para registrar la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro Varioskan. Los resultados se expresan por extrapolación con una curva de calibración de MDA de 0 a 10 mg.

## 5.8 Cuantificación de GSH total

La cuantificación de grupos tioles totales tiene como objetivo plasmar el nivel endógeno de sistemas antioxidantes. Para esta determinación los macrófagos se sembraron en placas tipo Petri de 60 mm a una concentración inicial de  $6 \times 10^4$  células. Se siguió con el protocolo de tratamientos y, al concluir las 24 h con el tratamiento correspondiente, las células se enjuagaron con PBS de 2 a 3 veces y se procedió a recolectar las células en 3 mL de PBS para realizar una lisis celular por choque térmico.

Una vez obtenido el lisado celular, se añadió a un tubo tipo eppendorf: 120 µL de agua destilada, 150 µL de lisado celular y 30 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, procediendo a homogenizar la muestra empleando un vortex. Una vez homogenizada, la muestra se colocó en hielo por 30 min; al término, se centrifugó a 8750 rpm por 5 min a 4 °C; una vez concluido este paso, se recolectó el sobrenadante en un tubo tipo eppendorf nuevo. En una placa de 96 pozos se colocó lo siguiente: 150 µL de solución Tris-EDTA a pH 8.2, 50 µL de muestra y 100 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) en metanol (Tietze, 1969). La placa se

incubó por 5 min a temperatura ambiente protegida de la luz para finalmente registrar la absorbancia a 412 nm. Los resultados se muestran por extrapolación a curva de calibración de GSH de 0 a 200  $\mu$ M.

### **5.9 Determinación de la actividad de catalasa (CAT)**

La actividad de CAT se determinó siguiendo la metodología descrita por Aebi en 1984. En una celda de cuarzo de 1 mL se colocaron las siguientes soluciones en orden: 570  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7 y 100  $\mu$ L de lisado celular. Antes de realizar la lectura se colocaron 335  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) 30 mM, inmediatamente se registró la absorbancia a 240 nm en intervalos de 5 s hasta alcanzar 6 lecturas en un espectrofotómetro de celdas. La actividad resultante de CAT se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$[CAT] = (\Delta ABS/min)(vol\ total)(factor\ de\ dilución) / (vol\ de\ muestra)(min)(0.0436)$$

Donde:

Vol total = 1 mL

Vol muestra = 0.1 mL

Min = 0.5 min

Coeficiente de extinción de  $H_2O_2$  = 0.0436

### **5.10 Determinación de la capacidad fagocítica**

La capacidad de fagocitosis de los macrófagos bajo tratamiento se determinó empleando el kit Vybrant Phagocytosis Assay Kit de Thermo Scientific™ (Thermo Scientific, 2023) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **5.11 Aislamiento de RNA y análisis por qPCR**

La cuantificación de la expresión relativa de RNAm, como estrategia para determinar la potencial polarización de macrófagos bajo las condiciones experimentales evaluadas, se realizó de la siguiente manera. El ARN celular total se aisló de los macrófagos RAW264.7 después de la incubación con los tratamientos con estimulación de LPS (60 ng/mL) siguiendo el protocolo del reactivo TRIzol (TRIzolTM, Invitrogen™, Waltham, MA, USA). Posteriormente, el ARNm aislado se transcribió inversamente hacia ADNc siguiendo las instrucciones del kit M-MLV RT de Promega® (Promega®, Madison, Wisconsin, USA). Al finalizar, se realizó la determinación por PCR en tiempo real empleando el protocolo del reactivo FastStart SYBR® Green Master (Roche, Basilea, CHE). El análisis de la expresión relativa de RNAm se realizó utilizando el sistema de PCR StepOne RealTime (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) con el siguiente programa: precalentar a 95 °C durante 10 min; desnaturización a 95 °C durante 15 s; alineamiento a 60 °C durante 1 min; curva de disociación 95 °C durante 15 s; de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los genes 18s rRNA y RPL0 se utilizaron para el método de normalización como parte del análisis de expresión relativa de  $\Delta\Delta Ct$ . Las secuencias de los iniciadores empleados para el análisis se detallan en la Tabla 2 a continuación.

*Tabla 2. Secuencias de los iniciadores empleados para el análisis de la expresión relativa de genes relacionados al fenómeno de polarización.*

Gen	Sentido	Reversa	Referencia
<b>Arg1</b>	CATTGGCTTGCAGACGTAGAC	GCTGAAGGTCTTCCATCACC	NM_007482.3
<b>CYBB</b>	TCAGTGAGCTTCCCTGTGTC	GCATTGCCTCGGTGATGT	NM_007807.5
<b>IL-1</b>	TGCCACCTTTGACAGTGATG	AAGGTCCACGGGAAAGACAC	NM_008361.4
<b>IL-6</b>	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTT	GCAAGTGCATCATCGTTGTTCATAC	NM_001314054.1
<b>IL-10</b>	GCCTTGCAGAAAAGAGAGCT	AAAGAAAGTCTTCACCTGGC	NM_010548.2

## 5.12 Microscopía

Se realizó la toma de imágenes representativas del cultivo de macrófagos al finalizar el periodo de incubación con los tratamientos correspondientes, con el objetivo de evaluar cambios en la morfología. Las imágenes fueron obtenidas con ayuda de un microscopio invertido Axio Observer II Zeiss (Zeiss, Oberkochen, DEU) bajo el filtro PHII con un aumento de 20x.

## 5.13 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes ( $n = 3$ ). El análisis estadístico para las diversas determinaciones realizadas se llevó a cabo aplicando ANOVA de una vía seguido de un análisis Dunnette para la comparación de medias ( $p < 0.01$ ) con el software GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software 2022, San Diego, CA, USA).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia de enfermedades relacionadas a la inflamación, como la obesidad y el sobrepeso, se han convertido en un problema de salud pública en gran parte del mundo. En México, se estima que alrededor del 75 % de la población mayor de 18 años padece de estas afecciones. Por lo anterior, es importante determinar la acción de diversos compuestos bioactivos como el RSV y D3T, con el fin de generar nueva información que coadyuve al diseño de diversas estrategias en el combate de enfermedades relacionadas a la inflamación donde los macrófagos estarían jugando un papel clave en su desarrollo y prevención.

Se ha reportado que los macrófagos bajo un estímulo de glucosa elevado, incluso durante períodos cortos, tienden a polarizarse en macrófagos de tipo M1 debido a la sobre-estimulación de la glucólisis; por lo cual, la glucosa juega un papel fundamental en la inducción de la respuesta pro-inflamatoria en macrófagos (Dissanayake *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que la fructosa también podría incrementar la respuesta pro-inflamatoria por la estimulación de la glucólisis y la lipogénesis (Todoric *et al.*, 2020), lo que en ambos casos potencia la activación de mecanismos pro-inflamatorios a través de NF-κB. En este sentido, los compuestos bioactivos como RSV y D3T contribuyen a revertir el progreso de dichos procesos pro-inflamatorios al inhibir la activación de NF-κB (RSV) o mitigar el estrés oxidativo intracelular a través de Nrf2 (D3T), respectivamente.

Por otro lado, al realizar experimentos *in vitro* con líneas celulares existen diferentes factores a considerar, especialmente cuando se trata de explicar su comportamiento en un contexto fisiológico de la enfermedad y homeostasis de tejido. Además, los subconjuntos de diversidad M1 y M2 no están firmemente diferenciados debido a la cantidad de factores que pueden influir en el microambiente, lo que implica que los macrófagos experimentan una transición dinámica entre estos fenotipos, lo cual afecta las propiedades efectoras de los macrófagos M1/M2. En este sentido, nuestro objetivo fue evaluar el cambio en las características de los macrófagos cultivados

en medios con glucosa estándar (GE), alta glucosa (HG), en ausencia o presencia de fructosa y con o sin aumento de la estimulación con LPS para simular la condición patológica de padecimientos relacionados a la inflamación, como lo es el sobrepeso y la obesidad, mediante la suplementación de compuestos bioactivos con potencial anti-inflamatorio.

La glucosa como la fructosa alta y los factores pro-inflamatorios, además de la activación de vías conocidas por los compuestos suplementados RSV (mTOR) y D3T (Nrf2), pueden proporcionar información sobre cómo estos subtipos de macrófagos M2 podrían contribuir en el control y tratamiento de varias patologías relacionadas a la inflamación. En este sentido, sabemos que el desarrollo de la obesidad y el sobrepeso va acompañado de un aumento tanto del estrés oxidativo como del proceso inflamatorio de bajo grado (Rakotoarivelo *et al.*, 2018; Arner *et al.*, 2019), donde puede influir a su vez el fenómeno de polarización de los macrófagos residentes. Por lo anterior, diversas estrategias de vanguardia exploran el uso de compuestos bioactivos con el potencial de reducir la cascada pro-inflamatoria (Vasileva *et al.*, 2018). En este trabajo suplementamos con D3T y RSV debido a su impacto y capacidad para reducir la inflamación a través de vías importantes involucradas en la regulación de la homeostasis celular como Nrf2 y Akt/mTOR, respectivamente (Liu *et al.*, 2020; Vasileva *et al.*, 2020).

## **6.1 Viabilidad y densidad celular de macrófagos RAW 264.7 bajo glucosa estándar y alta en ausencia o presencia de LPS**

Se realizó inicialmente una prueba de citotoxicidad indirecta (viabilidad) mediante el ensayo MTT, con el fin de determinar la cantidad de macrófagos RAW 264.7 metabólicamente activos, posterior a incubarlos con diferentes concentraciones de RSV y D3T (2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ M). Lo anterior con el objetivo de definir los intervalos de concentración no tóxicas para la línea celular, en diferentes concentraciones de hiperglicemia y estimulación con LPS (Figura 5).

Se ha determinado que los macrófagos pro-inflamatorios o M1 son comúnmente inducidos por productos microbianos (LPS), diferentes citocinas pro-inflamatorias o potencialmente por altas concentraciones de glucosa (Dissanayake *et al.*, 2021). Al incubar los macrófagos bajo glucosa estándar (GE) sin estimulación con LPS, tanto la suplementación de D3T como de RSV redujeron la viabilidad celular en un 4 y un 21 %, respectivamente (Figura 5A). Por otro lado, la viabilidad de los macrófagos aumentó significativamente en HG (25 mM) sin estimulación con LPS (Figura 5B); sin embargo, la suplementación con D3T y RSV normalizó la viabilidad celular en un 8 y un 25 %, respectivamente, bajo estas mismas condiciones. Además, el RSV a la concentración más alta (20  $\mu$ M) disminuyó en general la viabilidad de los macrófagos de un 20 a 25 %, tanto en GE como en HG (Figuras 5A y 5B).

La Figura 5C muestra que la viabilidad de los macrófagos en el grupo de GE disminuyó significativamente en un 14 % bajo estimulación con LPS (10 ng/mL), en comparación con la de los macrófagos en GE sin estimulación con LPS. Curiosamente, RSV exhibió un efecto protector sobre la viabilidad de los macrófagos en las concentraciones más altas (5 y 10  $\mu$ M) bajo estimulación de GE y LPS. Por otro lado, la estimulación con LPS (10 ng/mL) con HG generó un incremento aún mayor en la viabilidad de los macrófagos de hasta un 27 % ( $p < 0.01$ ) (Figura 5D); mientras que, la adición de D3T y RSV también mejoró la viabilidad de los macrófagos hasta un 16 y un 28.7 %, respectivamente ( $p < 0.01$ ), en comparación con los macrófagos tratados con HG. Además, la suplementación con RSV mostró un efecto protector sobre la viabilidad de los macrófagos en las concentraciones más altas bajo GE y HG con estimulación con LPS (Figuras 5C y 5D), en comparación con aquellos sin estimulación con LPS (Figuras 5A y 5B).

En las Figuras 5E y 5G se muestra que la viabilidad de los macrófagos en GE aumentó significativamente en 22.6 y 37.9 % con una estimulación de LPS de 60 ng/mL y 100 ng/mL, respectivamente; mientras que, la adición de D3T y RSV en todas las concentraciones normalizó la viabilidad de los macrófagos a pesar de la estimulación con LPS. De manera similar, la viabilidad de los macrófagos en HG

aumentó significativamente en un 47.6 y 65.7 % con 60 y 100 ng/mL de LPS, respectivamente (Figuras 5F y 5H), la cual aumentó aún más hasta un 53 y 77.4 % con la suplementación con D3T y RSV, respectivamente, de forma comparativa en relación a los macrófagos tratados con HG. En general, bajo condiciones de HG y estimulación con LPS (10, 60 y 100 ng/mL), los compuestos bioactivos D3T y RSV aumentaron la viabilidad de los macrófagos en comparación con las células tratadas con HG sin estimulación con LPS. Por el contrario, la suplementación con D3T y RSV disminuyó o no tuvo efecto sobre la viabilidad de los macrófagos en GE con y sin estimulación con LPS.

Inicialmente, y de forma inesperada, encontramos una disminución significativa en la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 al suplementar con la concentración más alta de RSV (20  $\mu$ M) en condiciones de GE y HG. Esto difiere de lo reportado por otros grupos para macrófagos suplementados con RSV a concentraciones de 30  $\mu$ M en condiciones de GE (Bigagli *et al.*, 2017; Palacz-Wrobel *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019). A su vez, macrófagos peritoneales primarios aislados de ratones y células RAW 264.7 se trataron con hasta 100  $\mu$ M de D3T para inducir las defensas antioxidantes celulares, sin encontrar un efecto negativo sobre la viabilidad de los macrófagos (Zhu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2022). De manera similar, no observamos ningún efecto adverso importante del D3T sobre la viabilidad de los macrófagos en condiciones de GE o HG (Figura 5).

La evaluación de ambos compuestos bioactivos RSV y D3T sobre la viabilidad de macrófagos en condiciones de HG y estimulación con LPS es escasa. Recientemente, se informó una reducción significativa de la viabilidad (alrededor del 12 %) con RSV 20  $\mu$ M en condiciones de HG más 10 ng/mL de estimulación con LPS (Saleh *et al.*, 2021). De manera similar, las células RAW 264.7 se pre-trataron con D3T en un rango de 0-100  $\mu$ M y luego se expusieron a LPS (10 ng/mL) para evaluar su potencial de inducción antioxidante; no obstante, no se reporta la viabilidad de estas células de macrófagos (Zhu *et al.*, 2022), lo que sugiere un bajo potencial citotóxico del D3T a diferencia del RSV como se reporta en este trabajo;

sin embargo, no se ha determinado la viabilidad bajo estimulación creciente con LPS. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer informe sobre el efecto de D3T en la viabilidad celular bajo la activación de macrófagos estimulados con HG y diferentes concentraciones de LPS.

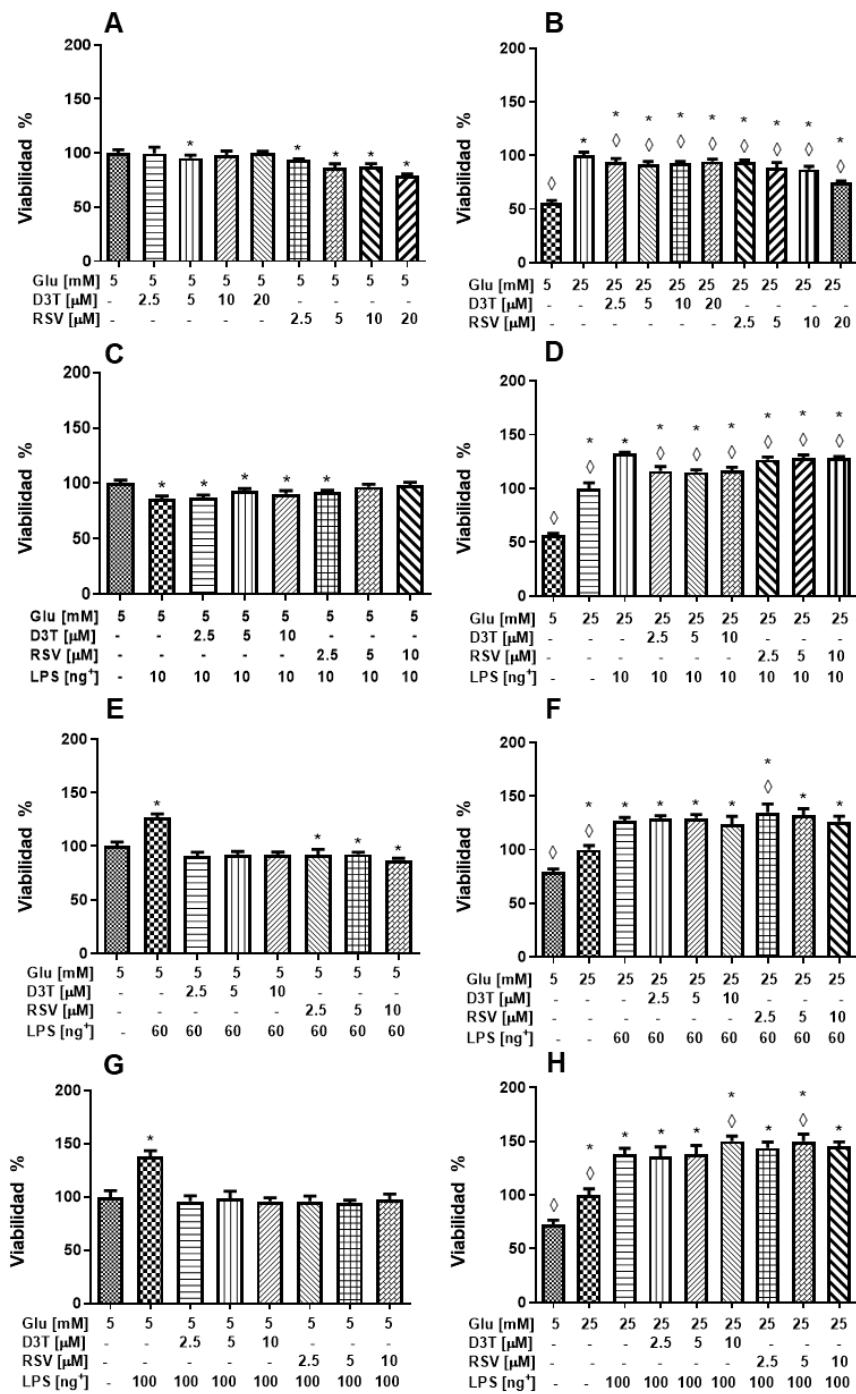


Figura 5. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre la viabilidad celular por MTT en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa y LPS. Viabilidad de macrófagos bajo: A) GE sin LPS, B) HG sin LPS, C) GE con 10 ng/mL de LPS, D) HG con 10 ng/mL de LPS, E) GE con 60 ng/mL de LPS, F) HG con 60 ng/mL de LPS, G) GE con 100 ng/mL de LPS, H) HG con 100 ng/mL de LPS.

D) HG con 10 ng/mL de LPS, E) GE con 60 ng/mL de LPS, F) HG con 60 ng/mL de LPS, G) GE con 100 ng/mL de LPS, H) HG con 100 ng/mL de LPS. \*Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control GE (5 mM) en las Figuras A, C, E y G, y  $\diamond$  indica diferencia estadística respecto al control HG sin LPS en la Figura B y HG estimulado con LPS en las Figuras D, F y H. +Concentración de LPS (ng/mL).

Los resultados obtenidos en los macrófagos RAW 264.7 sobre la cuantificación de proteínas por BCA aportan información interesante. De acuerdo con la Figura 6A, tanto el D3T como el RSV redujeron significativamente el contenido total de proteína celular bajo GE, con el mayor efecto observado a las concentraciones más altas de RSV. En este sentido, el D3T y el RSV redujeron significativamente el contenido de proteína celular total hasta en un 18 y 19.5 %, respectivamente ( $p < 0.01$ ).

Si bien se observó un efecto de "proliferación" en el contenido de proteína celular para macrófagos en medio HG (Figura 6B), esta cuantificación de proteína también mostró una disminución progresiva con las diferentes concentraciones de RSV, siendo de hasta 15 % a la mayor concentración de RSV (20  $\mu$ M) con respecto a los macrófagos control tratados con HG ( $p < 0.01$ ). Curiosamente, se observó un efecto protector del D3T en todas las concentraciones probadas; sin embargo, debido al efecto negativo en la concentración de proteína total del RSV a la concentración más alta (20  $\mu$ M), la suplementación de RSV y D3T a la concentración 20  $\mu$ M no se evaluó en los siguientes experimentos bajo estimulación con LPS.

Al agregar un estímulo de 10 ng/mL de LPS al cultivo celular, la tendencia de viabilidad de los macrófagos cambió por completo (Figuras 6C y 6D). En condiciones GE se detectó un aumento del 35.5 % en el contenido de proteína celular sobre el control sin LPS ( $p < 0.01$ ); sin embargo, se observó una disminución dependiente de la dosis en el contenido de proteína después de la suplementación con D3T y RSV (Figura 6C). Además, se observó un contenido de proteína celular

significativamente menor a la concentración más alta de D3T y RSV (10  $\mu$ M) bajo estimulación con LPS, en comparación con los macrófagos tratados con GE.

De manera interesante, observamos resultados similares en el contenido de proteína celular después de la suplementación con D3T y RSV en medio HG con estimulación con LPS (10, 60 y 100 ng/mL; Figuras 6D, 6F y 6H, respectivamente), en comparación con los resultados de viabilidad bajo las mismas condiciones (Figuras 5D, 5F y 5H, respectivamente). De manera similar a la viabilidad por MTT (Figuras 5E y 5G), la suplementación con D3T y RSV disminuyó o no tuvo efecto sobre el contenido total de proteína celular en medio GE con estimulación de LPS (60 y 100 ng/mL, respectivamente).

De acuerdo al análisis de los datos obtenidos se presentó una correlación positiva entre el ensayo de viabilidad de MTT y el contenido de proteína celular total ( $p < 0.01$ ); sin embargo, los resultados de la viabilidad por MTT y proteína por BCA en condiciones de HG sugieren que la proliferación de células RAW 264.7 depende tanto de un incremento de la glucólisis como de la actividad mitocondrial (Venter *et al.*, 2014). De manera similar, Venter y colaboradores determinaron la proliferación de macrófagos RAW 264.7 como la masa total de proteína en ausencia y presencia de 100 ng/mL de LPS (Venter *et al.*, 2014), observando un aumento de hasta aproximadamente 110 % en la concentración de proteína después de 24 h de incubación con LPS.

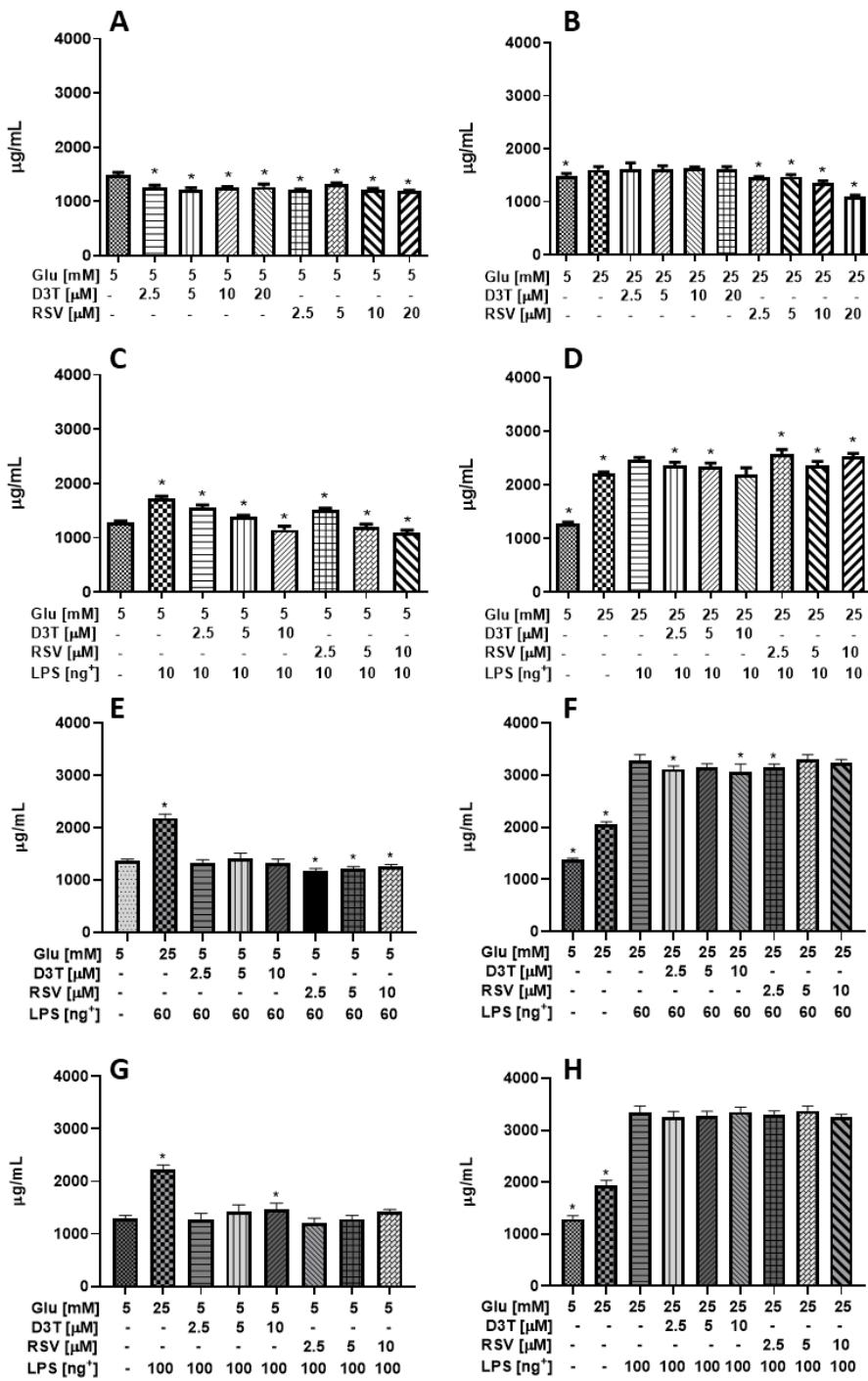


Figura 6. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre el contenido de proteína celular total por BCA de la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación alta en glucosa y LPS. El contenido total de proteínas de los macrófagos mediante el ensayo de

proteínas BCA en: (A) GE sin LPS, (B) HG sin LPS, (C) GE con 10 ng/mL de LPS, (D) HG con 10 ng/mL de LPS, (E) GE con 60 ng/mL de LPS, (F) HG con 60 ng/mL de LPS, (G) GE con 100 ng/mL de LPS y (H) HG con 100 ng/mL de LPS. \* Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al GE control en (A, C, E, G), e indica diferencia estadística respecto al control HG sin LPS en (B) y HG estimulado con LPS en (D, F, H). + Concentración de LPS (ng/mL).

## 6.2 Cambios en la producción de ON por el efecto de la suplementación de D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 bajo glucosa estándar o glucosa alta con estimulación por LPS

La detección de óxido nítrico (ON) en medio de cultivo de macrófagos es una estrategia para monitorear la activación o la disminución de mecanismos proinflamatorios mediante el uso de un estímulo como el LPS. Por tanto, la eficacia de un tratamiento puede evaluarse en función de la inhibición o reducción de la concentración de nitritos derivada de las condiciones experimentales (Figura 7).

Contrario a lo esperado, la estimulación con LPS a 10 ng/mL aumentó la producción de ON solo en un 13 y 21 % en condiciones GE y HG, respectivamente; contenido que se redujo aún más, hasta un 17 %, con la suplementación con D3T bajo GE (Figura 7A) y hasta un 22 % con RSV bajo HG (Figura 7B), lo que indica un efecto diferencial entre D3T y RSV dependiendo de la concentración de glucosa. Por otro lado, la estimulación con LPS a 60 ng/mL aumentó la producción de ON en un 68 y un 64 % en condiciones GE (Figura 7C) y HG (Figura 7D), respectivamente. Como era de esperar, se observó una reducción dosis dependiente en la producción de ON para ambos compuestos bioactivos en condiciones GE y HG, con la mayor reducción de hasta un 36 % con D3T en medio GE y un 39 % con RSV en condiciones HG. De manera similar, la estimulación con LPS a 100 ng/mL aumentó la producción de NO en un 75 y 65 % en condiciones GE (Figura 7E) y HG (Figura 7F), respectivamente. Aunque se observó una reducción dosis dependiente

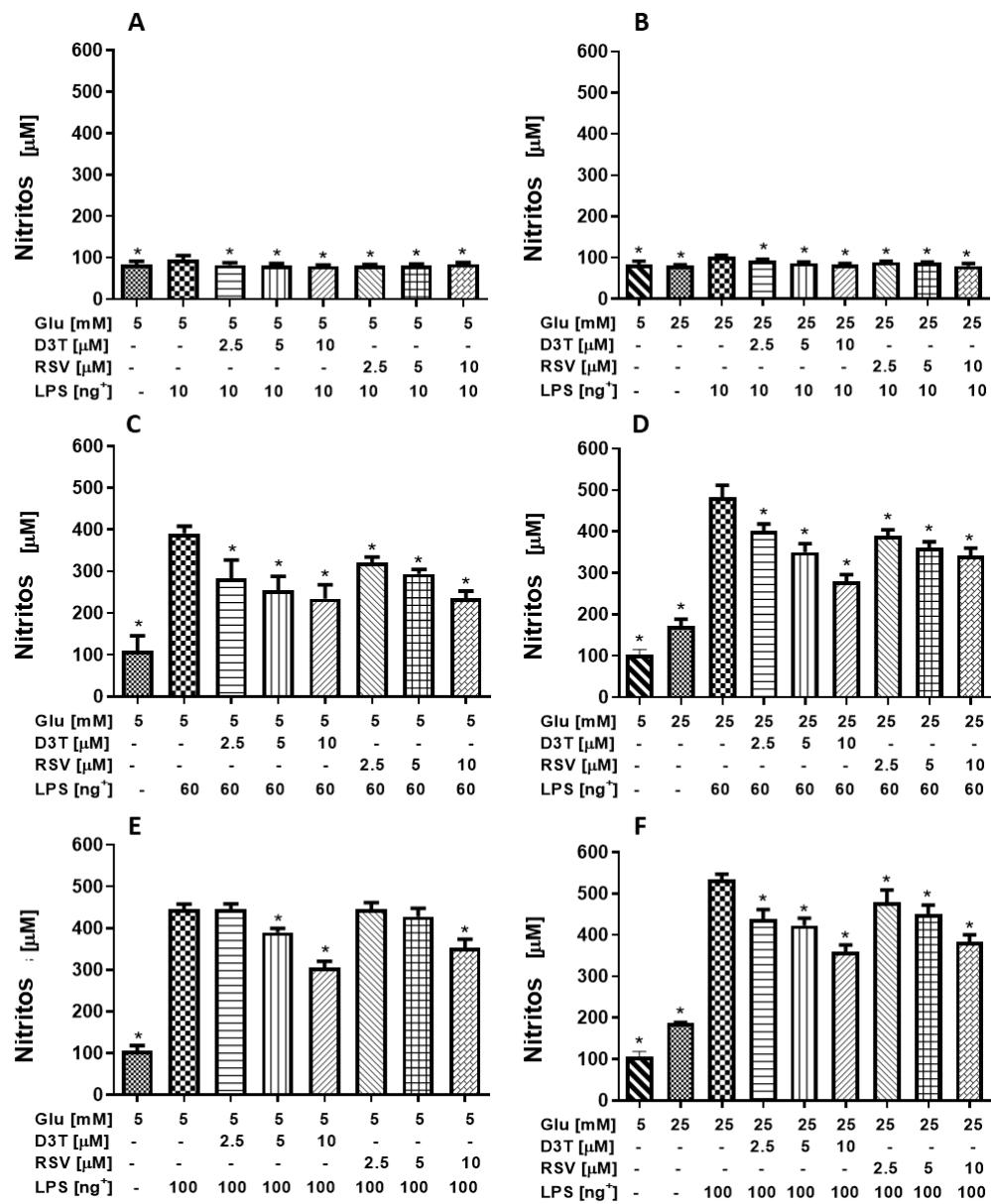
pronunciada en el contenido de ON para ambos compuestos bioactivos en condiciones GE y HG, en comparación con los tratamientos de 60 ng/mL de LPS, la suplementación con D3T mostró el mejor efecto dosis respuesta con una reducción máxima de 33% a la concentración más alta de 10  $\mu$ M ( $p < 0.01$ ).

En general, se observó una mejor reducción dosis dependiente en la producción de ON por parte de ambos compuestos bioactivos al emplear 60 y 100 ng/mL de estimulación con LPS; por lo tanto, la estimulación con LPS a 10 ng/mL no se evaluó en determinaciones posteriores. Del mismo modo, al observar un efecto desfavorable sobre la viabilidad celular de los macrófagos principalmente con la suplementación con RSV a 20  $\mu$ M en condiciones de GE y HG se decidió excluir esta concentración para ambos compuestos bioactivos (RSV y D3T) en determinaciones posteriores.

Dentro de lo reportado en la literatura, Saleh y colaboradores indicaron no haber encontrado diferencias en la producción de ON en condiciones similares de glucosa (5 mM) y suplementación con RSV en un rango de 5 a 20  $\mu$ M (Saleh *et al.*, 2021), lo que se asemeja a lo reportado en este estudio. Las diferencias pueden radicar en que el grupo de Saleh mantuvo el cultivo en pre-tratamiento con RSV durante 24 h previo a la estimulación con LPS; por tanto, el periodo de exposición al compuesto bioactivo, como el orden de estimulación con LPS y el volumen celular inicial para realizar la determinación, juegan un papel fundamental en los mecanismos de activación y producción de ON.

Estas diferencias en la estrategia experimental se centran en la prevención de la generación de un fenotipo M1, siendo que al incubar inicialmente con compuestos bioactivos, se asumiría una caracterización de macrófagos M2; sin embargo, al incubar inicialmente con LPS el efecto de estos compuestos sobre la polarización de macrófagos M1 sería evaluado hacia un fenotipo de M2, lo que difiere de la estrategia reportada en la literatura y, en un contexto de enfermedad, sería un abordaje más adecuado.

Recientemente, Zhu y colaboradores (2022) informaron una reducción dosis dependiente de la concentración de ON de hasta un 20% mediada por D3T (0 a 25  $\mu$ M) bajo estimulación con LPS de 10 ng/mL (Zhu *et al.*, 2022). Al igual que en los estudios previos con RSV, la reducción de la concentración de ON lograda por D3T en macrófagos estimulados con 10 ng/mL de LPS bajo GE responde a una incubación previa con este compuesto bioactivo durante 24 h y posteriormente a la inducción con LPS durante otras 24 h. Por otro lado, Yu y colaboradores (2019) reportaron la inhibición de mecanismos pro-inflamatorios con RSV inducidos por LPS (1  $\mu$ g/mL) en macrófagos RAW 264.7, en base a la disminución estadísticamente significativa en la expresión relativa de iNOS. Si bien no se muestran los resultados sobre la detección de ON en medio de cultivo se puede inferir que, derivado de la inhibición en la expresión relativa de iNOS, la suplementación con 30  $\mu$ M de RSV normalizó los niveles de ON similar a los reportados para las células control (Yu *et al.*, 2019).



**Figura 7. Efecto de la suplementación con RSV y D3T en la cuantificación de NO en medio celular de la línea RAW 264.7 en condiciones de GE y HG y estimulados con 10, 60 o 100 ng/mL de LPS. Cuantificación de nitritos en: A) GE con 10 ng/mL de LPS, B) HG con 10 ng/mL de LPS, C) GE con 60 ng/mL de LPS, D) HG con 60 ng/mL de LPS, E) GE con 100 ng/mL de LPS y F) HG con 100 ng/mL de LPS. \* Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al tratamiento control con LPS sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS en (ng/mL).**

### **6.3 Efecto del D3T y RSV sobre el estrés oxidativo (GSH y MDA) en macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones estándar y altas de glucosa bajo estimulo de LPS**

Diversos estudios indican que la hiperglucemia es un factor de riesgo en el desarrollo de diversas condiciones de salud como las enfermedades cardiovasculares y renales. La hiperglucemia promueve un cambio metabólico en los macrófagos, tanto en la tasa de la fosforilación oxidativa como una glucólisis excesiva (Galván-Peña y O'Neil, 2014), si esta condición persiste podría conducir a un aumento importante del estrés oxidativo intracelular en los macrófagos. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar el estado antioxidante de los macrófagos en condiciones de HG con estimulación con LPS (60 o 100 ng/mL) y su modulación mediante la suplementación con D3T y RSV (2.5, 5 y 10  $\mu$ M).

Como se esperaba, la suplementación con D3T y RSV aumentó significativamente el contenido de GSH intracelular de los macrófagos bajo GE, con un incremento de hasta 39 % con D3T de manera dosis dependiente (Figura 8A). Contrario a lo esperad, el contenido intracelular de GSH bajo todos los tratamientos en HG fue mayor que los niveles de macrófagos en condición de GE (Figura 8B). De manera similar, la suplementación con D3T en la condición de HG aumentó significativamente los niveles de GSH hasta en un 30 % de forma dosis dependiente; por el contrario, la suplementación con RSV disminuyó significativamente el nivel de GSH intracelular en la concentración más alta (10  $\mu$ M) con respecto al control de HG.

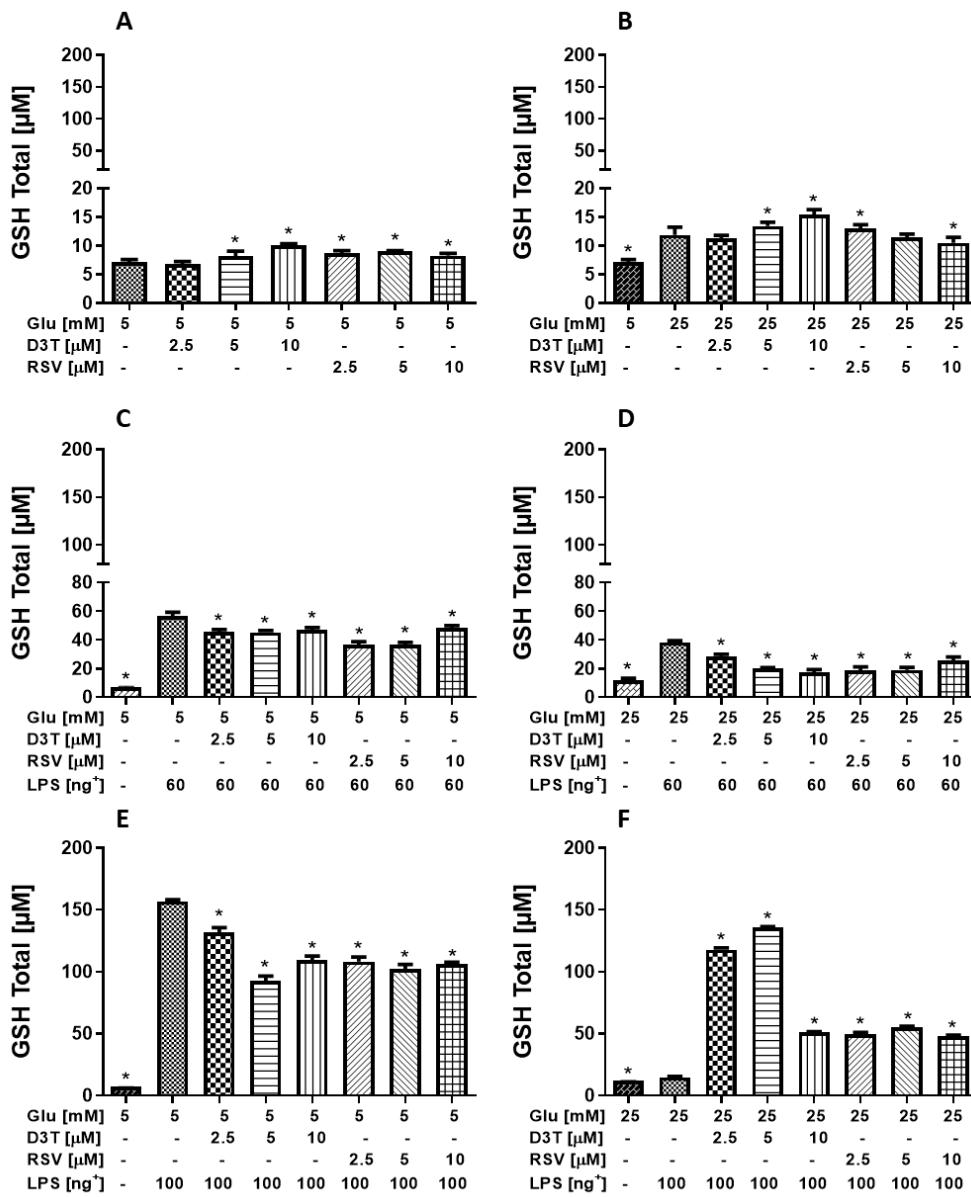
Los resultados obtenidos de la cuantificación de GSH intracelular de macrófagos estimulados con 60 y 100 ng/mL de LPS en GE (Figuras 8C y 8E) mostraron un aumento de 7.3 y 21.9 veces, respectivamente, en comparación con el contenido de los macrófagos no estimulados con LPS. Interesantemente, los niveles de GSH intracelular de macrófagos suplementados con D3T y RSV en todas las concentraciones fueron significativamente más bajos que los de su control

respectivo de 60 y 100 ng/mL estimulados con LPS bajo GE (Figuras 8C y 8E); sin embargo, estos niveles de GSH fueron más altos que los de los macrófagos sin estimulación con LPS (Figura 8A).

En condiciones de HG, el nivel de GSH intracelular de los macrófagos estimulados con 60 ng/mL de LPS (Figura 8D) aumentó hasta 3.2 veces, en comparación con el de los macrófagos control sin estimulación con LPS (Figura 8B). De manera similar, los niveles de GSH de macrófagos suplementados con todas las concentraciones DE D3T y RSV fueron significativamente más bajos que los de los macrófagos estimulados con 60 ng/mL de LPS bajo HG; aun así, permanecieron más altos que los niveles de GSH de los no estimulados con LPS. Contrario a lo esperado, el nivel de GSH de los macrófagos estimulados con 100 ng/mL de LPS en condiciones de HG (Figura 8F) arrojó un valor más cercano al de los macrófagos control sin estimulación de LPS. Además, tanto los macrófagos tratados con D3T como los tratados con RSV mostraron niveles más altos de GSH que los macrófagos control estimulados con LPS bajo HG, con los niveles más altos a 2.5 y 5  $\mu$ M de D3T.

En este sentido, los niveles intracelulares inducidos de GSH en macrófagos RAW 264.7 suplementados con diferentes compuestos como la N-acetil-l-cisteína, la bromosulfoftaleína y el D3T en medio estándar sin estimulación con LPS (Song *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2022), concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio tras la suplementación con D3T o RSV sin estimulación con LPS.

De acuerdo a lo esperado, el tratamiento con D3T muestra, en general, una mayor concentración de GSH en la mayoría de las condiciones evaluadas en GE o HG, lo que indica que la estimulación de la vía Nrf2 mejora significativamente el estado antioxidante de los macrófagos. Por el contrario, bajo determinadas condiciones e independientemente de la concentración del RSV, no observamos diferencias significativas en los niveles de GSH bajo las condiciones evaluadas.



*Figura 8. Efecto de la suplementación con D3T y RSV sobre la concentración intracelular de GSH total en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglucemia y estimulados con 60 o 100 ng/mL de LPS. Contenido total de GSH bajo: A) GE; B) HG; C) GE con 60 ng/mL de LPS; D) HG con 60 ng/mL de LPS; E) GE con 100 ng/mL de LPS; F) HG con 100 ng/mL de LPS. \* Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control GE o condición HG con estimulación con LPS y sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS en (ng/mL).*

El ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se realiza para medir la peroxidación de lípidos en una variedad de líneas celulares, muestras de tejido y fluidos biológicos. El ensayo se basa en la detección de malondialdehído (MDA), que es el principal producto de oxidación de lípidos y, a menudo, se considera una referencia del nivel de estrés oxidativo en la muestra. En este sentido, los macrófagos RAW 264.7 estimulados con 60 y 100 ng/mL de LPS bajo HG mostraron niveles más altos de MDA (96, 121 y 40.7 %, respectivamente) que los macrófagos control sin estimulación con LPS bajo la condición de GE (Figura 9A), cuyo contenido se incrementó aún más con 60 y 100 ng/mL de LPS bajo HG (164 y 198.8 %, respectivamente).

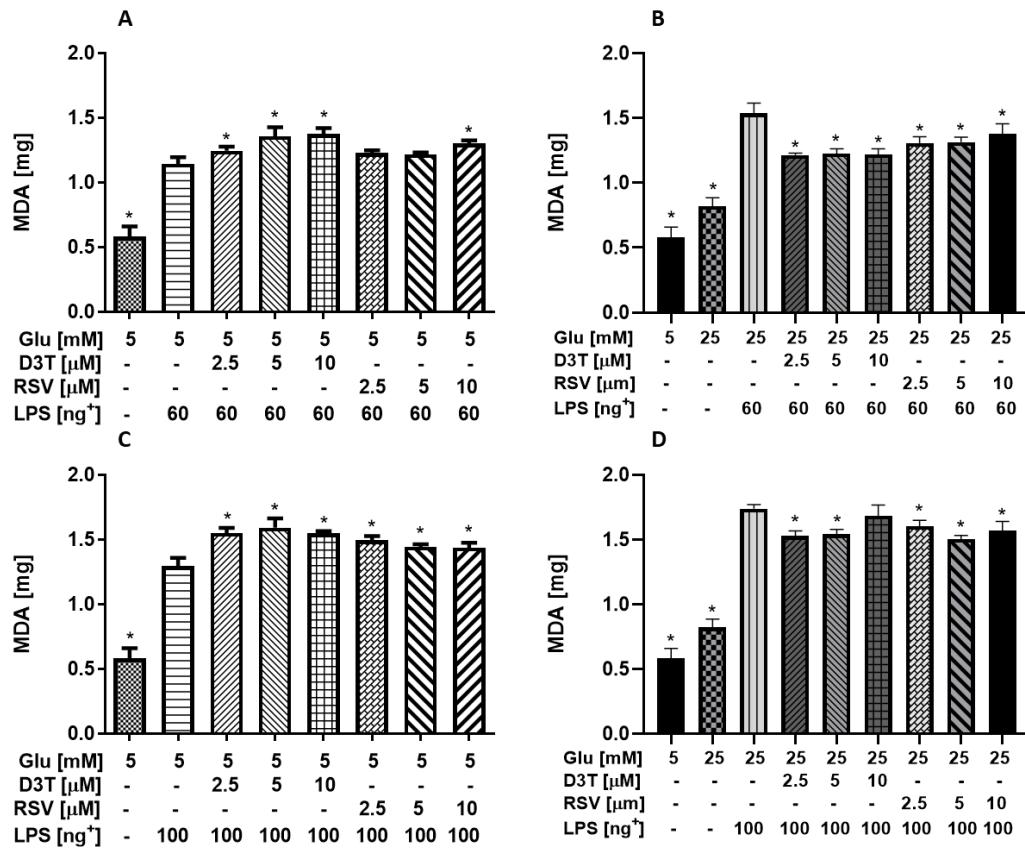
De forma contraria a lo esperado, se observaron aumentos significativos en los niveles de MDA de hasta 14 y 9 % con 60 ng/mL de LPS, y de hasta 17.4 y 156.7 % con 100 ng/mL de LPS con D3T y RSV, respectivamente, en condiciones de GE (Figuras 9A y 9C). Por el contrario, los niveles de MDA fueron significativamente más bajos con la suplementación con D3T y RSV a 60 y 100 ng/mL de LPS en condiciones de HG (Figuras 9A y 9C), siendo aún más altos que los niveles de MDA de los macrófagos control estimulados con LPS.

En general, los resultados sugieren que los niveles de MDA aumentaron después de la suplementación con D3T o RSV en condiciones GE a 60 y 100 ng/mL de LPS; mientras que, los valores de MDA fueron más bajos después de la suplementación con D3T o RSV en condiciones de HG a 60 y 100 ng/mL de LPS.

La evaluación del aumento de los procesos de peroxidación lipídica mediados por el estrés oxidativo inducido por LPS también se ha reportado para macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones de GE estimulados con 1  $\mu$ g/mL de LPS. Por ejemplo, la suplementación con derivados del RSV, como el 3,3',4,5'-tetrametoxi-trans-estilbeno y el 3,4',5-trimetoxi-trans-estilbeno, disminuyó significativamente los niveles intracelulares de MDA hasta en un 50 %, independientemente de la concentración de ambos compuestos (10 y 50  $\mu$ M) (Zhou *et al.*, 2021). Estos

resultados difieren de los mostrados en la Figura 11, ya que la determinación de MDA se realizó en el medio de cultivo posterior a la incubación con D3T o RSV, a diferencia del grupo de Zhou, quienes evaluaron el contenido intracelular de MDA, observando una disminución significativa de la concentración de MDA bajo GE.

Aunque las concentraciones intracelulares de MDA son importantes para monitorear el estado de vías metabólicas como la  $\beta$ -oxidación, la determinación de MDA en el medio de cultivo es una forma de evaluar la cantidad de metabolitos con potencial pro-inflamatorio que podrían interactuar con las células de un tejido. Los tratamientos con RSV mostraron una menor concentración de MDA en condiciones GE; mientras que, aquellos con D3T mostraron los mejores resultados en condiciones HG, lo que sugiere que la estimulación de Nrf2 por D3T podría contribuir a una menor inflamación tisular en condiciones de hiperglucemia.



*Figura 9. Efecto de la suplementación con D3T y RSV sobre la concentración de MDA en el medio de cultivo de la línea celular RAW 264.7 bajo GE y HG estimulados con LPS. Contenido de MDA en: A) GE con 60 ng/mL de LPS; B) HG con 60 ng/mL de LPS; C) GE con 100 ng/mL de LPS; D) HG con 100 ng/mL de LPS. \*Indica diferencia estadística (p < 0.01) respecto al control GE con LPS para A y C; HG con LPS para B y D. +Concentración de LPS (ng/mL).*

#### 6.4 Supresión de la respuesta por-inflamatoria en la línea celular RAW 264.7 por D3T y RSV en condiciones de hiperglicemia

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de NO y GSH bajo estimulación de LPS a 100 ng/mL, donde no se observaron disminuciones significativas con las concentraciones más bajas de compuestos bioactivos (2.5 μM)

ni en la cuantificación de MDA en condiciones de HG, se decidió no evaluar los tratamientos con estimulación de LPS a 100 ng/mL para las determinaciones de la expresión relativa de genes.

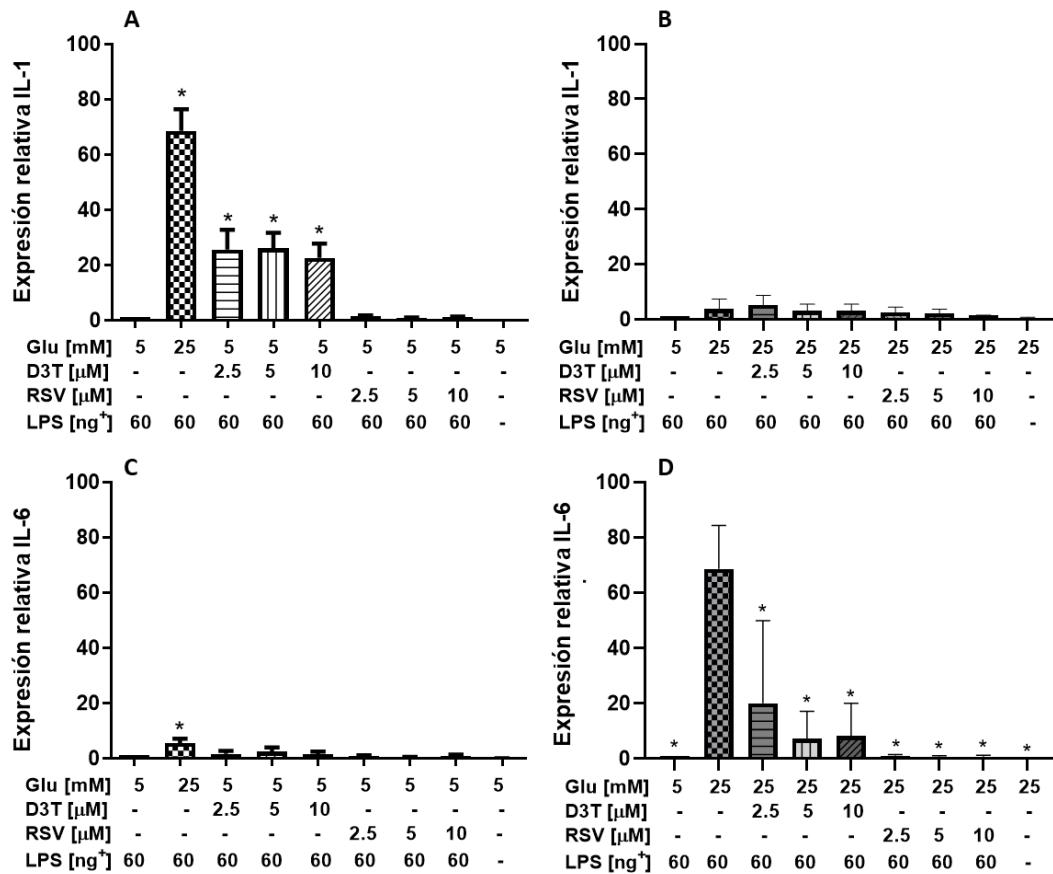
Los resultados de la expresión relativa de citocinas pro-inflamatorias se muestran en la Figura 12. Contrario a lo esperado, no se observó un aumento en la expresión relativa de IL-1 después de la estimulación con LPS en GE (Figura 10A) y HG (Figura 10B) para los controles; sin embargo, se puede observar un comportamiento contrastante en la expresión de esta interleucina cuando se incuba con los compuestos bioactivos. En general, los tratamientos con D3T disminuyeron la inducción de IL-1 hasta en un 64 % con respecto al control inflamado; mientras que, los tratamientos con RSV disminuyeron la expresión a niveles similares a los del control GE sin incubación con LPS (Figura 10A).

Esta tendencia no se observa en los tratamientos con HG, donde la incubación con los compuestos bioactivos en general no muestra una disminución significativa con respecto al control inflamado (Figura 10B). Por el contrario, se observó una inducción significativa de IL-1 (aumento de hasta 67 veces,  $p < 0.01$ ) en macrófagos tratados con HG y estimulados con 60 ng/mL de LPS, con respecto a los macrófagos bajo GE, ambos sin suplementación de compuestos bioactivos (Figura 10A). De manera interesante, la suplementación con D3T aumentó significativamente la expresión relativa de IL-1 hasta en un 67 %; mientras que, la suplementación con RSV indujo ligeramente la expresión relativa de IL-1 a valores similares a los de los macrófagos bajo GE sin suplementación con compuestos bioactivos y estimulados con 60 ng/mL de LPS ( $p > 0.05$ ). Por el contrario, bajo la condición de HG (Figura 10B) observamos una reducción de hasta 18 y 64 % en la expresión relativa de IL-1 por D3T y RSV, respectivamente, excepto por el aumento significativo de hasta 6.1 veces empleando una concentración de 2.5  $\mu$ M de D3T.

Por otra parte, la expresión relativa de la IL-6 en macrófagos bajo HG estimulados con 60 ng/mL de LPS fue tan solo de 5.5 veces mayor que la de los macrófagos

tratados con GE ( $p < 0.01$ , Figura 10C). De manera similar, la suplementación con D3T aumentó ligeramente la expresión relativa de IL-6 hasta 0.6 veces con GE (Figura 10C), la cual disminuyó significativamente en hasta 6.3 veces al incubar bajo HG (Figura 10D); mientras que, la suplementación con RSV disminuyó la expresión relativa de esta interleucina (IL-6) a valores similares (hasta 0.3 veces) a los de los macrófagos bajo GE sin suplementación con compuestos bioactivos, disminución que también se presentó hasta un 23 % respecto a los macrófagos bajo HG estimulados con 60 ng/mL de LPS sin suplementación de compuestos bioactivos ( $p < 0.01$ , Figuras 10C y 10D). Estos resultados son de gran relevancia ya que la expresión relativa de la IL-6 en los macrófagos tratados con HG y estimulados con 60 ng/mL de LPS fue de hasta 68 veces más que la de los macrófagos bajo HG sin estimulación ( $p < 0.01$ , Figura 10C).

Los niveles de expresión relativa de IL-1 e IL-6 en condiciones experimentales de GE en macrófagos estimulados con LPS a 60 ng/mL fueron superiores a los reportados por diferentes autores, especialmente para RSV con un estímulo de LPS de 10 ng/mL bajo concentraciones estándar de glucosa (Qureshi *et al.*, 2012; Saleh *et al.*, 2021). Sin embargo, se observó la misma reducción en la expresión relativa de ARNm cuando los macrófagos se incubaron con análogos de RSV como el pterostilbeno, mostrando una disminución significativa de hasta un 50 % en la expresión relativa de ARNm de IL-1 en comparación con la de los macrófagos de control (Jayakumar *et al.*, 2021). Finalmente, en el presente estudio se encontró que el D3T disminuyó la expresión relativa de IL-1 hasta en un 71 % en comparación con los macrófagos bajo GE con 60 ng/mL de estimulación con LPS. Aunado a lo anterior, el tratamiento con D3T también condujo a una supresión dependiente de la concentración de la producción de IL-1 inducida por LPS y, a su vez, una menor liberación de ON en células RAW 264.7 bajo GE.



*Figura 10. Expresión relativa de genes pro-inflamatorios por efecto de la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa y LPS (60 ng/mL). A) y B) expresión relativa de IL-1 en GE y HG con 60 ng/mL de LPS, respectivamente; C) y D) expresión relativa de IL-6 en GE y HG con 60 ng/mL de LPS, respectivamente. \*Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control: A) y C) control de GE más LPS sin compuesto bioactivo; B) y D) control de HG más LPS sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS (ng/mL).*

## **6.5 Inducción de la respuesta anti-inflamatoria y marcadores moleculares del fenotipo M2 por D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS en condiciones de hiperglicemia**

Con respecto a la IL-10 (Figuras 11A y 11B), la expresión de esta interleucina en macrófagos sin estimulación con LPS fue de hasta un 70 y 50 % menor en comparación con aquellos bajo GE y HG con estimulación de LPS, respectivamente; mientras tanto, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de IL-10 entre los macrófagos tratados con GE y HG estimulados con 60 ng/mL de LPS sin compuestos bioactivos. De manera interesante, la suplementación con D3T a una concentración de 5  $\mu$ M fue la única condición que aumentó significativamente hasta 6 veces la expresión relativa de IL-10, en comparación con la de los macrófagos control GE ( $p < 0.01$ ); sin embargo, no observamos un efecto dosis respuesta para ambos compuestos bajo GE (Figura 11A). Por el contrario, se observó una inducción dosis respuesta en la expresión relativa de IL-10 posterior a la suplementación con D3T en condiciones de HG, siendo estadísticamente significativa para la concentración más alta ( $p < 0.01$ ). Aunque no fue estadísticamente significativa, la expresión relativa de IL-10 después de la suplementación con RSV fue mayor que la de los macrófagos de control de HG estimulados con 60 ng/mL de LPS (Figura 11B).

Por otro lado, no fue posible detectar un efecto dosis respuesta en la expresión relativa del marcador M1 CYBB (Figuras 11C y 11D) para ambos compuestos bajo estimulación con GE y LPS (60 ng/mL). De manera reciente, CYBB se ha propuesto como un marcador novedoso por su participación en la generación de ERO y en las funciones pro-inflamatorias de los macrófagos M1 (Gerrick *et al.*, 2018). En este sentido, la expresión relativa de CYBB fue significativamente mayor hasta 3.5 y 7 veces posterior a la suplementación con D3T 2.5  $\mu$ M y RSV 5  $\mu$ M, respectivamente (Figura 11C), bajo estimulación con GE y LPS (60 ng/mL). Además, la expresión relativa de CYBB fue significativamente mayor hasta 6 veces después de la

suplementación con RSV 2.5  $\mu$ M (Figura 11D) en condiciones de HG con 60 ng/mL de LPS.

Aunque la Arg1 se ha identificado como un marcador del fenotipo M2 por otros grupos de trabajo (Miao *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2020), bajo las condiciones experimentales evaluadas encontramos, en general, disminuciones significativas en la expresión relativa después de la suplementación con D3T en condiciones de GE y estimulación con LPS de hasta un 64 y 58 % a una concentración de 2.5 y 10  $\mu$ M, respectivamente, comparadas al control de GE sin suplementación de compuestos bioactivos (Figura 11E). Por el contrario, bajo estimulación con GE y LPS sólo se pudo determinar un ligero aumento (hasta un 11 %) en la expresión de Arg1 con 2.5  $\mu$ M de RSV. Por otro lado, es posible notar una tendencia general de disminución en la expresión relativa de Arg1 con las concentraciones de D3T y RSV (65 y 58 %, respectivamente) en macrófagos en medio HG; mientras que, D3T a 2.5  $\mu$ M fue la única condición que aumentó la expresión relativa de Arg1 (alrededor del 26 %), similar a la observada en macrófagos en HG sin LPS (Figura 11F).

En general, la expresión relativa de IL-10 y el marcador de tipo M1 CYBB fue mayor en condiciones de HG con 60 ng/mL de LPS. Contrario a lo esperado, ambos niveles de ARNm fueron mayores después de la estimulación con LPS y bajo HG, en comparación con la expresión relativa bajo GE y HG sin estimulación con LPS.

La expresión relativa de IL-10 en condiciones de HG concuerda con lo reportado por Chung y colaboradores en macrófagos diferenciados bajo HG con estimulación con LPS (100 ng/mL) (Chung *et al.*, 2015). En general, el tratamiento con D3T bajo hiperglicemia mostró una mayor inducción en la expresión relativa de IL-10 en comparación con RSV, lo que sugiere que la regulación bajo la estimulación de Nrf2 podría ser más eficiente que la inducción de mTOR. De manera similar, Palacz-Wrobel y colaboradores reportaron una disminución de hasta el 36 % en la expresión de IL-10 posterior a la suplementación con RSV (30  $\mu$ M) bajo estimulación con GE y LPS (100 ng/mL) (Palacz-Wrobel *et al.*, 2017). Por otro lado, Yu y

colaboradores observaron una inducción deficiente del ARNm de IL-10 utilizando una concentración similar de RSV en condiciones de GE-LPS (1  $\mu$ g/mL) (Yu *et al.*, 2019). Estos resultados son consistentes con los mostrados en nuestro estudio (Figura 11A), donde se observó una diferencia estadística no significativa en la expresión relativa de IL-10 a diferentes concentraciones de RSV con respecto a los macrófagos de control. Hasta donde sabemos, no existen estudios disponibles sobre los efectos de D3T sobre la expresión relativa de IL-10; esto es de gran relevancia ya que D3T a una concentración de 5  $\mu$ M aumentó significativamente los niveles de IL-10 en condiciones similares a las descritas anteriormente.

A pesar de que la Arg1 es un gen importante en la actividad de macrófagos M2, no encontramos una inducción significativa de este gen en las condiciones experimentales evaluadas. Por el contrario, observamos reducciones significativas en la expresión relativa de Arg1 de hasta un 58 y 62 % en condiciones GE después de la suplementación con D3T y RSV, respectivamente, alcanzando niveles similares de expresión relativa con 2.5  $\mu$ M de RSV en comparación a los macrófagos bajo GE sin LPS. Así mismo, solo los macrófagos suplementados con D3T 2.5  $\mu$ M en condiciones de HG presentaron una expresión relativa de Arg1 similar a la del control bajo HG sin LPS; además, se observó una disminución significativa en la expresión de Arg1 para el resto de los tratamientos en el orden del 66 al 59 % para D3T y RSV, respectivamente. Este comportamiento de la Arg1 concuerda con lo reportado por Figueiredo y colaboradores, quienes sugieren que la inducción de este gen por compuestos bioactivos podría verse afectada por el microambiente al que están sometidos los macrófagos (Figueiredo *et al.*, 2020).

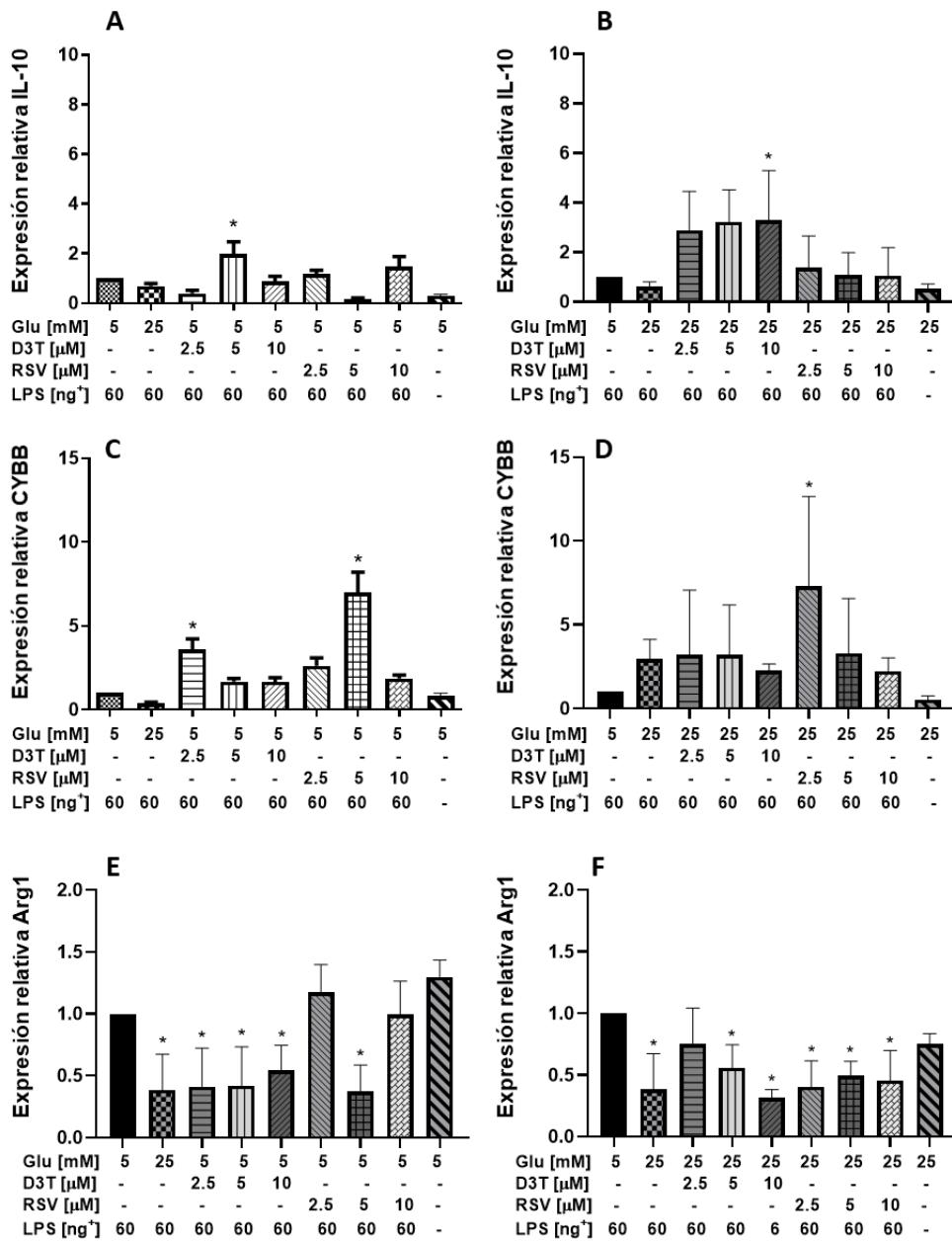


Figura 11. Expresión relativa de la citocina anti-inflamatoria IL-10, el biomarcador M1 CYBB y el biomarcador M2 Arg1 después de la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa y LPS (60 ng/mL). A) y B) expresión relativa de IL-10 bajo GE y HG con 60 ng/mL de LPS, respectivamente; C) y D) expresión relativa de CYBB bajo GE y HG con 60 ng/mL de LPS, respectivamente. E) y F) expresión relativa de Arg1 bajo GE y HG con 60

*ng/mL de LPS, respectivamente \*Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control GE con estimulación de LPS sin compuesto bioactivo para A, C) y E); y para B), D) y F) respecto al control de HG con estimulación de LPS sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS (ng/mL).*

## **6.6 Cambios morfológicos mediados por estimulación con LPS bajo glucosa estándar y alta glucosa en macrófagos RAW 264.7 suplementados con D3T y RSV**

En general, las imágenes obtenidas con el microscopio invertido (Figura 12) mostraron que los macrófagos RAW 264.7 incubados bajo medio GE y estimulación con LPS presentan cambios más extensos en la membrana (Figuras 12A a 12G; 12AI a 12GI; 12AII a 12GII) que aquellos en medio HG (Figuras 12H a 12N; 12HI a 12NI; 12HII a 12NII), los cuales exhibieron una membrana mucho más redondeada. De la misma manera, es posible observar que la suplementación con D3T y RSV en todas las concentraciones aparentemente mejoró la respuesta de la membrana de los macrófagos en condiciones de GE; sin embargo, no se observa el mismo efecto en los macrófagos suplementados en condiciones de HG. Además, la estimulación con LPS a la mayor concentración (100 ng/mL) aumentó la extensión de la membrana bajo GE, siendo los macrófagos tratados con D3T bajo HG y 100 ng/mL de LPS los que presentaron características similares a las células incubadas bajo GE sin estimulación con LPS. Esto podría indicar que este compuesto bioactivo podría estar estimulando la activación de la membrana de los macrófagos en condiciones de HG por la inducción de Nrf2. En consecuencia, esta mejora en las extensiones de membrana podría ser una característica importante debido a que sería un indicador de una mayor capacidad fagocítica en condiciones de HG, lo que contribuiría significativamente al papel de los macrófagos como elemento del sistema inmunitario innato en diferentes patologías.

Los cambios morfológicos de los macrófagos RAW 264.7 bajo estimulación con HG, LPS y suplementación con compuestos bioactivos fueron notables a lo largo del estudio. En este sentido, las imágenes obtenidas sobre la morfología celular mediante microscopía mostraron varias similitudes con las reportadas por Venter y colaboradores (Venter *et al.*, 2014), donde se muestra que una alta concentración de glucosa en presencia de LPS genera una sobre activación de la glucólisis, alterando así las características morfodinámicas de los macrófagos.

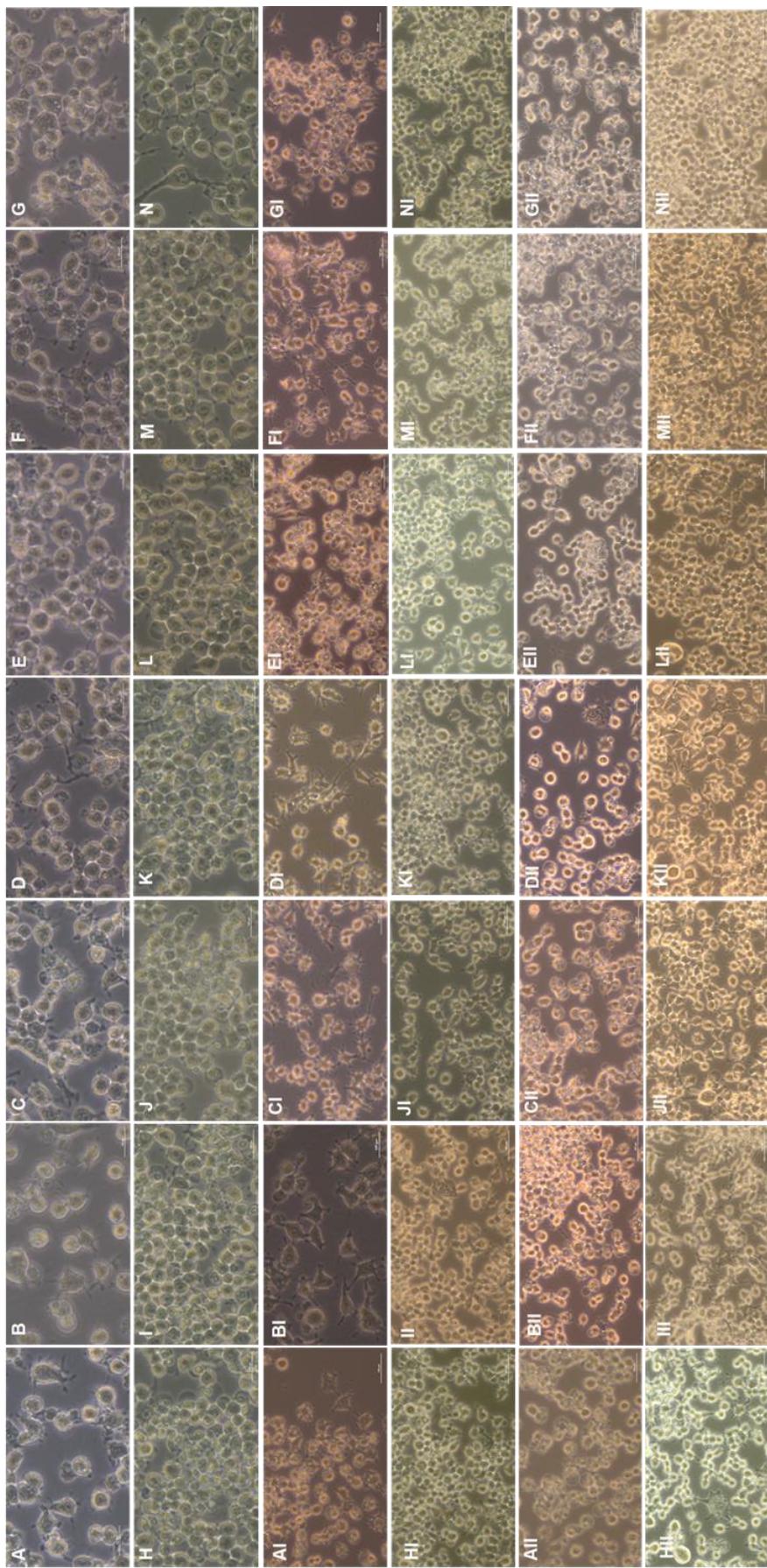


Figura 12. Efecto de los compuestos bioactivos D3T y RSV sobre la morfología y confluencia de la línea celular RAW 264.7. Condición GE con 10 ng/ml de estimulación de LPS: A) Control; B) 2,5  $\mu$ M de D3T; C) 5  $\mu$ M de D3T; D) 10  $\mu$ M de D3T; E) 2,5  $\mu$ M de RSV; F) 5  $\mu$ M de RSV; G) 10  $\mu$ M de RSV. Condición HG con 10 ng/ml de estimulación de LPS: H) Control; I) 2,5  $\mu$ M de D3T; J) 5  $\mu$ M de D3T; K) 10  $\mu$ M de D3T; L) 2,5  $\mu$ M de RSV; M) 5  $\mu$ M de RSV; N) 10  $\mu$ M de RSV. El orden de los tratamientos de A) a N) corresponde a tratamientos con un estímulo de 60 ng/ml de LPS, respectivamente. El orden de los tratamientos de AII) a NII) corresponde a tratamientos con un estímulo de 100 ng/ml de LPS, respectivamente.

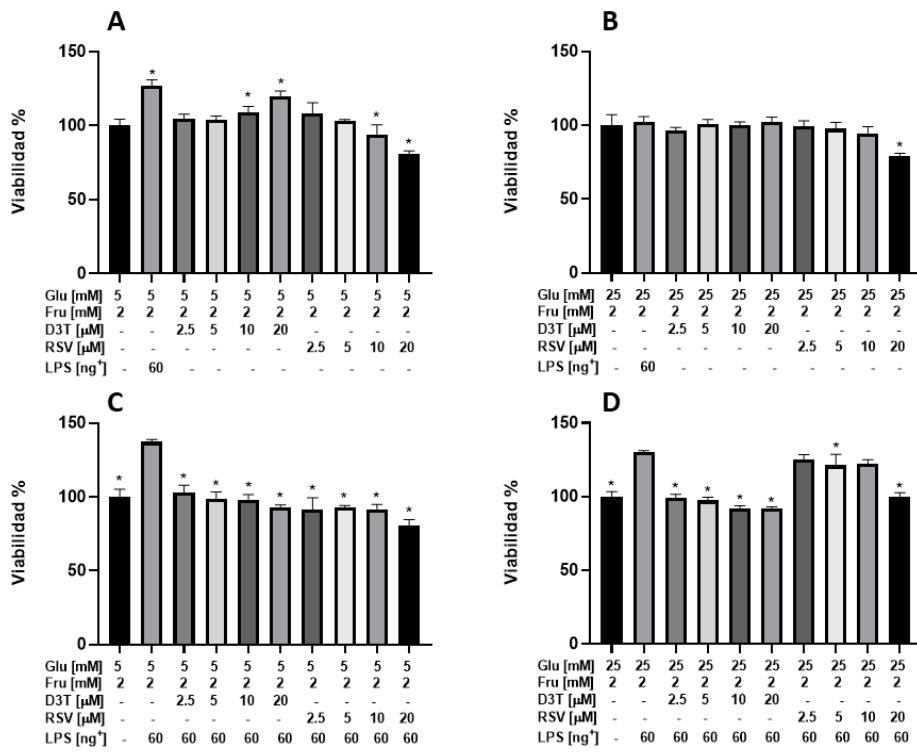
## **6.7 Viabilidad y densidad celular de macrófagos RAW 264.7 bajo hiperglicemia en ausencia o presencia de LPS con suplementación de fructosa**

Derivado de los resultados previos, las concentraciones de 10 y 100 ng/mL de LPS no arrojaron resultados concretos entre las diferentes concentraciones de compuestos bioactivos, se optó por evaluar la suplementación de fructosa bajo estimulación de LPS a una concentración de 60 ng/mL, debido que el comportamiento del cultivo de macrófagos RAW 264.7 a esta concentración mostró los resultados más relevantes.

Al suplementar fructosa (2 mM) bajo GE o HG y sin estimulación de LPS se encontró que, similar a los resultados obtenidos anteriormente, el RSV a la concentración más alta (20  $\mu$ M) disminuyó la viabilidad de los macrófagos en un 19 y 20 % en GE como en HG, respectivamente (Figura 13A y 13B); por lo cual, tanto el RSV como el D3T a la concentración de 20  $\mu$ M tampoco se consideraron para las determinaciones posteriores.

Las diferentes concentraciones con RSV (2.5, 5 y 10  $\mu$ M) bajo HG suplementadas con fructosa y 60 ng/mL de LPS muestran, en general, un incremento promedio en la viabilidad de un 7.2 % respecto al control HG (Figura 13B). Además, no se observó algún efecto desfavorable o potencialmente citotóxico bajo la administración de D3T a las distintas concentraciones evaluadas (2.5, 5 y 10  $\mu$ M). Hasta donde se ha reportado este es el primer informe sobre el comportamiento de ambos bioactivos bajo las condiciones evaluadas.

Si bien los efectos más relevantes sobre la viabilidad de estos macrófagos bajo estimulación con fructosa se presentan en las diferentes concentraciones de RSV, cabe destacar que, debido a la sobre activación de la glicólisis por parte de la fructosa (Dissanayake *et al.*, 2021), estos incrementos pudieran ser resultado de un aumento en la actividad mitocondrial y no de la activación de mecanismos de supervivencia directamente.

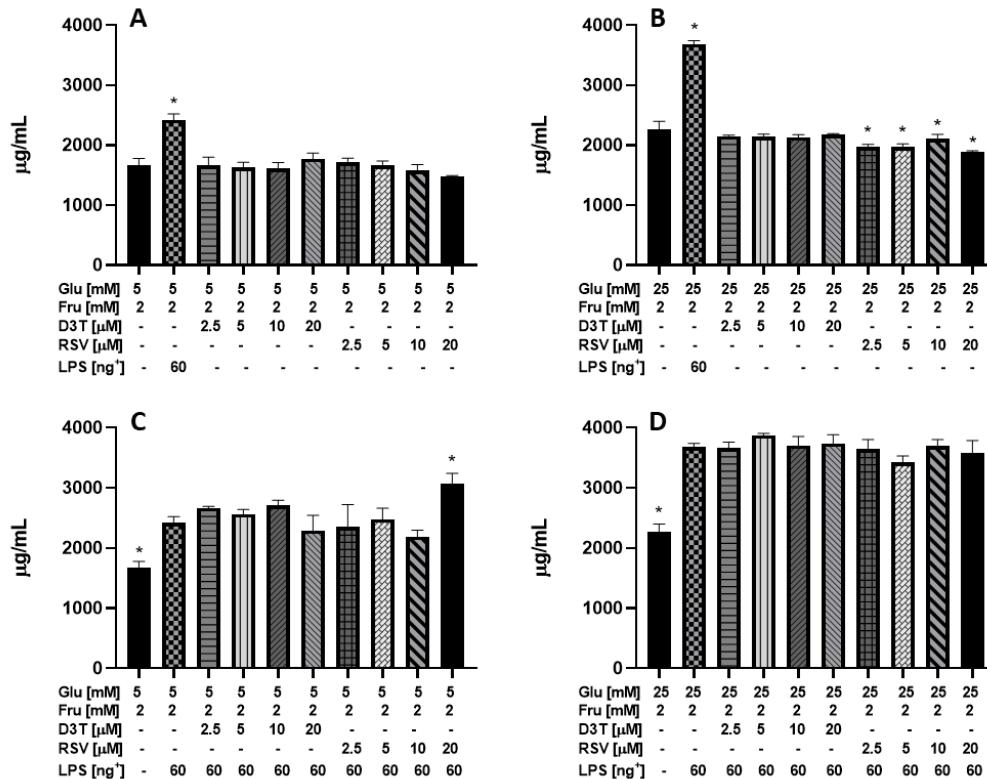


*Figura 13. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre la viabilidad celular por MTT en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación con glucosa, LPS y fructosa. Viabilidad de macrófagos bajo: A) GE sin LPS y fructosa, B) HG sin LPS y fructosa, C) GE con 60 ng/mL de LPS y fructosa, D) HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa. \* Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control GE o HG sin LPS (A y B, respectivamente), e indica diferencia estadística respecto al control HG con LPS (C y D, respectivamente). +Concentración de LPS (ng/mL).*

En cuanto a la determinación de proteína total, la suplementación de los compuestos bioactivos bajo condiciones de GE y HG con fructosa y estimulación de 60 ng/mL de LPS (Figura 14) incrementó de manera importante la concentración de proteína total, esto respecto al control de GE y HG sin LPS (Figuras 14A y 14B); no obstante, la concentración se incrementó significativamente hasta en un 44 y 52 % para los controles de GE y HG suplementados con fructosa y 60 ng/mL de LPS,

respectivamente (Figuras 14A y 14B). Bajo estimulación con 60 ng/mL de LPS no se detectaron diferencias importantes en el contenido de proteína a las diferentes concentraciones de compuestos bioactivos bajo las condiciones evaluadas.

Al igual que los resultados de viabilidad por MTT, hasta donde tenemos conocimiento, los datos obtenidos de la concentración de proteína empleando fructosa bajo estas condiciones de hiperglicemia, compuestos bioactivos y estimulación con LPS, son el primer reporte sobre el comportamiento de este parámetro sobre la línea RAW 264.7.



*Figura 14. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre el contenido de proteína celular total por BCA de la línea celular RAW 264.7 bajo GE y HG bajo estimulación de LPS y fructosa. El contenido total de proteínas de los macrófagos mediante el ensayo de proteínas BCA en: A) GE sin LPS y fructosa, B) HG sin LPS*

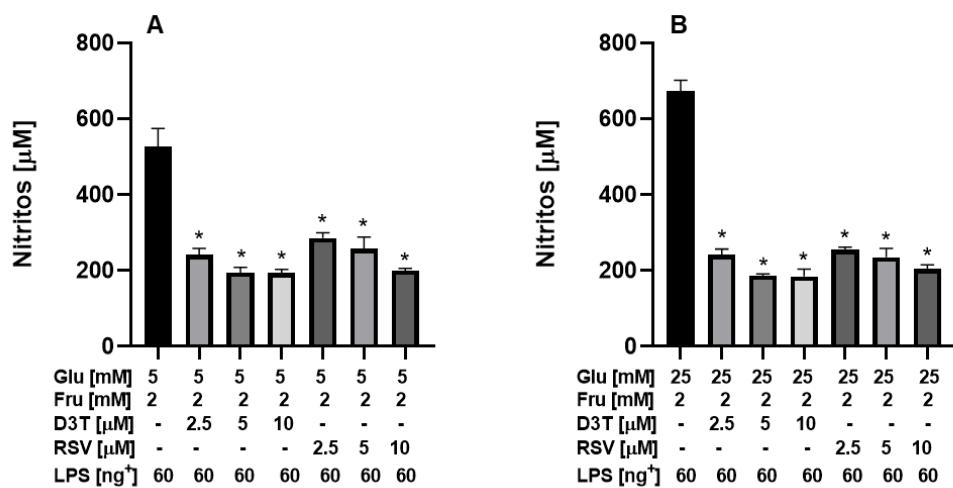
y fructosa, C) GE con 60 ng/mL de LPS y fructosa, D) HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa. \* Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control GE o HG sin LPS (A y B, respectivamente), e indica diferencia estadística respecto al control HG con LPS (C y D, respectivamente). +Concentración de LPS (ng/mL).

## 6.8 Cambios en la producción de ON por el efecto de D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 bajo glucosa estándar o glucosa alta con estimulación por LPS y fructosa

Al incubar los macrófagos con las diferentes concentraciones de compuestos bioactivos, sumado a la estimulación con LPS (60 ng/mL) y suplementación con fructosa (2 mM), se puede destacar inicialmente un incremento en la concentración de nitritos de hasta un 40 y 39 % en los tratamientos de GE y HG estimulados con LPS y fructosa (Figuras 15A y 15B), respectivamente, en comparación con los resultados para las mismas concentraciones sin la suplementación de fructosa (Figura 7C y 7D). En cuanto a la suplementación de los compuestos bioactivos, las diferentes concentraciones de D3T redujeron hasta un 60.15 % la concentración de nitritos, con la mayor disminución a la concentración de 10  $\mu$ M de hasta 63.3 % en GE; por su parte, las concentraciones de RSV disminuyeron hasta un 52.9 %, con la mayor disminución a la concentración de 10  $\mu$ M de hasta 61.9 % en GE.

En general, se observó un ligero efecto dosis respuesta por parte de ambos compuestos bioactivos en GE y HG. Estos efectos dosis respuesta se mantuvieron en condiciones de HG, donde la suplementación con D3T disminuyó la producción de ON hasta un 69.5 %. De manera similar, la suplementación con RSV disminuyó la concentración de ON, en promedio, hasta 65.5 %. En ambos casos, al igual que en los tratamientos en GE, los mayores efectos sobre la disminución en la concentración de ON se presentaron a las concentraciones más altas de los compuestos bioactivos. Un estudio realizado por Spruss y colaboradores señala que el tratamiento con fructosa sobre macrófagos RAW 264.7 induce la transcripción de

la iNOS, lo cual a su vez incrementa la concentración de ON detectable en el medio (Spruss *et al.*, 2011). Esto concuerda con los resultados obtenidos de la suplementación con fructosa donde se reportan incrementos significativos en la detección de ON respecto al medio sin fructosa bajo las mismas condiciones experimentales. Resulta interesante destacar que la disminución del ON bajo estimulación con LPS y fructosa es de hasta 32 y 48 % bajo GE y HG al suplementar los macrófagos con D3T y RSV (Figura 15), respectivamente, en comparación a las mismas condiciones sin la suplementación con fructosa (Figura 7). Lo anterior podría ser relevante en el contexto de generar una menor infiltración de monocitos promovida por la respuesta inflamatoria durante períodos de hiperglicemia prolongados, lo cual también podría potenciar los mecanismos de homeostasis del tejido y disminuir la progresión de enfermedades relacionadas a la inflamación. Es importante señalar que estos resultados son los primeros reportados en relación a la detección de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 bajo las condiciones evaluadas.



*Figura 15. Efecto de la suplementación con RSV y D3T sobre la cuantificación de NO en medio celular de la línea RAW 264.7 en condiciones de GE y HG, estimulados 60 ng/mL de LPS y fructosa. Cuantificación de nitritos en: A) GE con*

60 ng/mL de LPS y fructosa; B) HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa. \*Indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.01$ ) respecto al tratamiento control con LPS sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS en (ng/mL).

## **6.9 Efecto del D3T y RSV sobre la respuesta al estrés oxidativo (GSH y CAT) en macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones de hiperglicemia, estimulación con LPS y suplementación con fructosa**

Continuando con la evaluación sobre el impacto de los compuestos bioactivos sobre la respuesta al estrés oxidativo por parte de mecanismos endógenos, del mismo modo que en las evaluaciones previas, la suplementación de fructosa al cultivo celular disminuye significativamente la concentración de GSH; observándose una disminución del 80 y 48 % en las condiciones control bajo GE y HG con un estimulación de LPS y fructosa (Figura 16A y 16B), respectivamente, comparado a las mismas condiciones experimentales sin la adición de fructosa (Figura 8C y 8D). En cuanto a los compuestos bioactivos, se observaron disminuciones promedio en la concentración de GSH de 23 % para las concentraciones de D3T y del 22 % para las de RSV bajo GE (Figura 16A). Así mismo, se observó un patrón similar para los tratamientos en HG, registrándose aumentos en el contenido de GSH de hasta 30 y 10 % en las concentraciones más altas tanto de D3T como de RSV, respectivamente (Figura 16B).

Por otra parte, la determinación de la actividad de CAT arrojó resultados interesantes sobre su comportamiento. Bajo GE, las diferentes concentraciones de D3T con estimulación con LPS y fructosa incrementaron significativamente de manera dosis respuesta la actividad de la CAT en un 60.3, 105.4 y 118.9 % en las concentraciones evaluadas (2.5, 5 y 10  $\mu$ M), respectivamente (Figura 16C); sin embargo, las concentraciones con RSV, a pesar de también presentar un efecto dosis respuesta, no mostraron diferencia estadística significativa respecto al control sin bioactivo bajo la misma condición experimental. Por el contrario, bajo

condiciones de HG se presentó un resultado similar para las concentraciones con D3T con incrementos en la actividad en el orden de 66, 75.8 y 149.8 % a concentraciones de 2.5, 5 y 10  $\mu$ M, respectivamente (Figura 16D), no así para las concentraciones de RSV.

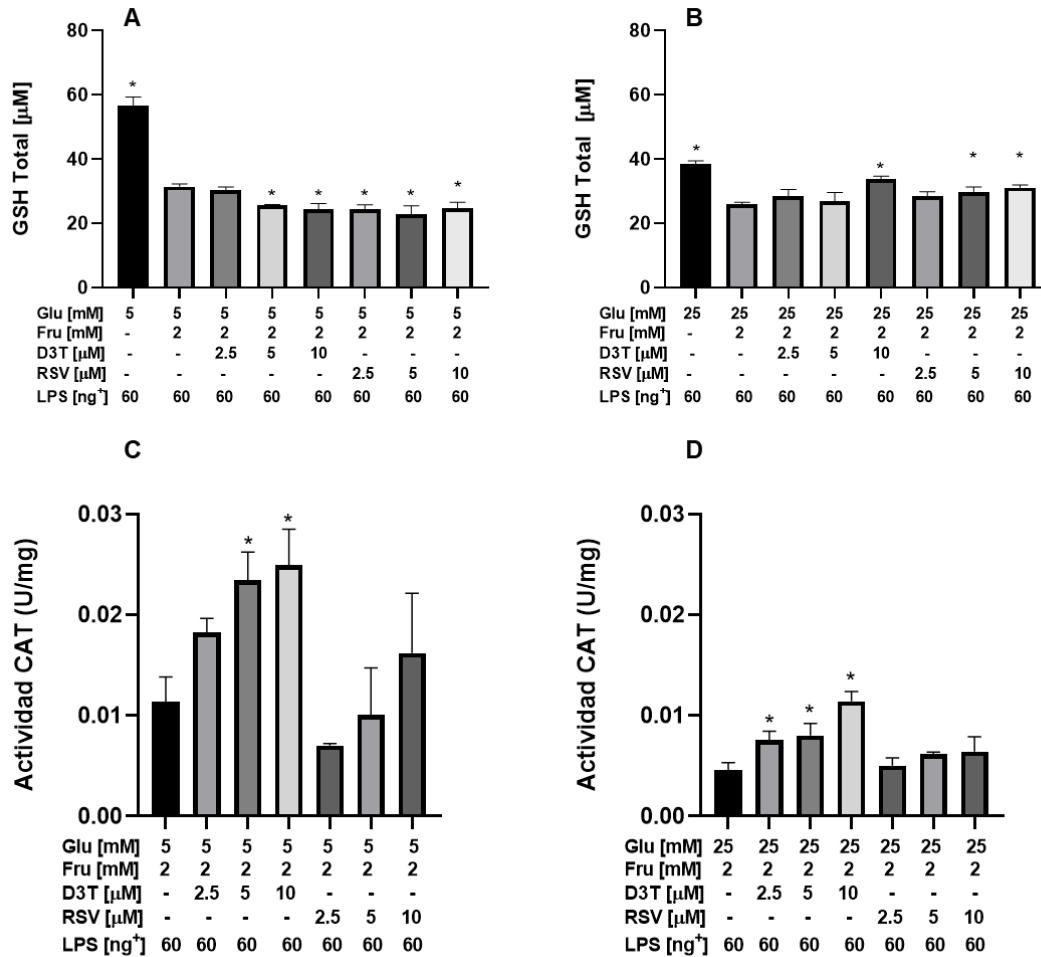


Figura 16. Efecto de la suplementación con D3T y RSV sobre los niveles intracelulares de GSH total y la actividad de CAT en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglucemia, estimulados con 60 ng/mL de LPS y suplementados con fructosa. Contenido total de GSH bajo: A) GE con 60 ng/mL de LPS y fructosa, B) HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa. Actividad de CAT bajo: C) GE con 60 ng/mL de LPS y fructosa, D) HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa. \*Indica diferencia estadística ( $p <$

0.01) respecto al control GE (A y B) o condición GE con estimulación con LPS y sin compuesto bioactivo (C y D). +Concentración de LPS en (ng/mL).

La información sobre el estudio del comportamiento de los sistemas antioxidantes endógenos bajo suplementación con fructosa es escasa. En este sentido, es importante explorar más a fondo estas características debido a las implicaciones de estos mecanismos en el desarrollo de enfermedades relacionadas a la inflamación. Lo anterior debido a que, si bien podría esperarse que diversos compuestos bioactivos tengan un efecto similar en el incremento de mecanismos antioxidantes endógenos, esto estaría fuertemente influenciado tanto por las condiciones del microambiente como por los blancos moleculares implicados. Del mismo modo, hasta donde conocemos estos resultados son los primeros reportados bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente.

## **6.10 Supresión de la respuesta pro-inflamatoria en la línea celular RAW 264.7 por D3T y RSV en condiciones de hiperglicemia y estimulación con fructosa**

Al analizar los resultados de viabilidad, concentración de ON y elementos antioxidantes (GSH y CAT) bajo GE y HG en presencia de fructosa, se procedió a reafirmar las diferencias en los subconjuntos de macrófagos M2 bajo estas condiciones en comparación con los resultados previos de expresión relativa de genes.

De manera inicial podemos observar similitudes bajo algunas de estas condiciones, en comparación con aquellas sin suplementación de fructosa (Figura 10). Bajo condiciones de GE se obtienen disminuciones importantes en la expresión relativa de IL-1 con tratamientos tanto de D3T como de RSV, logrando las mayores disminuciones a las concentraciones más altas de estos bioactivos (10  $\mu$ M), en hasta 3.5 y 3 veces, respectivamente (Figura 17A). Así mismo, a estas

concentraciones se alcanzaron niveles de expresión de IL-1 similares a las del control sin compuesto bioactivo bajo las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, este efecto cambia interesantemente al incubar en HG y fructosa, donde se presentan incrementos estadísticamente significativos de hasta 2.09 y 0.86 veces con D3T y RSV, respectivamente, en sus concentraciones más bajas (2.5  $\mu$ M), respecto al control inflamado sin compuesto bioactivo (Figura 17B).

Los resultados obtenidos sobre la expresión relativa de IL-6 (Figuras 17C y 17D) muestran un cambio total con respecto a las determinaciones realizadas bajo las mismas condiciones sin suplementación con fructosa (Figuras 10C y 10D); en donde, la mayor disminución relativa de IL-6 se presentó bajo las concentraciones con RSV, alcanzando niveles similares a los del control sin inflamar bajo GE y HG. Por otra parte, al suplementar fructosa no se encontraron, en general, diferencias significativas bajo las diferentes concentraciones de bioactivos respecto al control de GE, excepto para la concentración de RSV 2.5  $\mu$ M, la cual indujo la expresión de este gen hasta 1.9 veces respecto al control con GE (Figura 17C). De forma similar, no se observaron cambios importantes bajo condiciones de HG (Figura 17D); por ejemplo, a las diferentes concentraciones de D3T se presentaron niveles de expresión relativa similares al control bajo HG.

Es importante destacar la inducción en la transcripción de IL-6 a la concentración de RSV a 2.5  $\mu$ M de hasta 1.6 veces respecto al control de HG. De manera interesante, se incrementó la expresión relativa de ambas citocinas IL-1 e IL-6 a la concentración más baja de RSV. De acuerdo a Gambaro y colaboradores (2018), lo anterior pudiera deberse a la persistencia de la hiperglicemia en el microambiente celular, lo cual podría estar potenciado por la suplementación con fructosa. Este tipo de efectos podrían estar interfiriendo, a su vez, en la respuesta de los mecanismos de homeostasis celular de los macrófagos generando la persistencia del fenotipo M1, lo cual tendría concordancia con la relación de este fenotipo y el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas relacionadas a la inflamación.

Al igual que los resultados previos donde se suplementó fructosa al cultivo de macrófagos, hasta donde conocemos los resultados presentados en este estudio sobre la expresión relativa de IL-1 e IL-6 bajo las condiciones experimentales evaluadas son los primeros en su tipo.

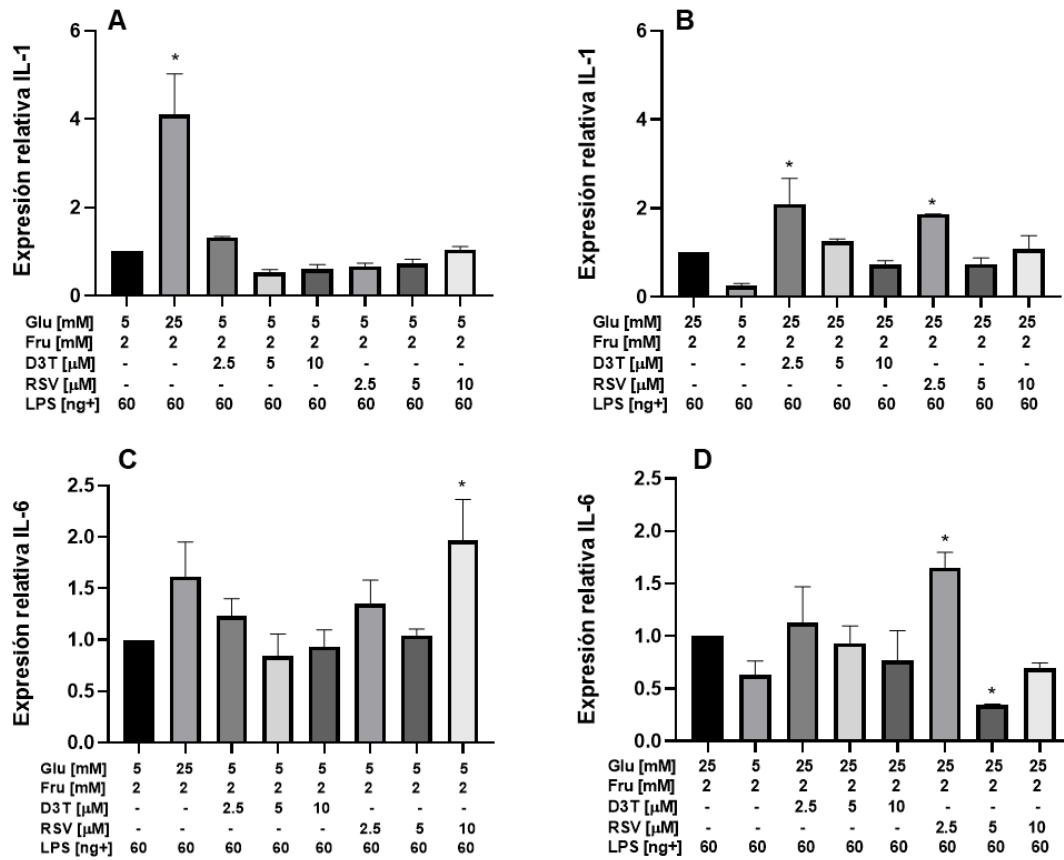


Figura 17. Expresión relativa de genes pro-inflamatorios por efecto de la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglucemia, LPS (60 ng/mL) y fructosa. A) y B) expresión relativa de IL-1 en GE y HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa, respectivamente; C) y D) expresión relativa de IL-6 en GE y HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa, respectivamente. \*Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control: A) y C) control de GE más LPS sin

compuesto bioactivo; B) y D) control de HG más LPS sin compuesto bioactivo.

<sup>†</sup>Concentración de LPS (ng/mL).

### **6.11 Inducción de la respuesta anti-inflamatoria y expresión relativa de marcador molecular del fenotipo M2 por D3T y RSV en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS en condiciones de hiperglicemia y estimulación con fructosa**

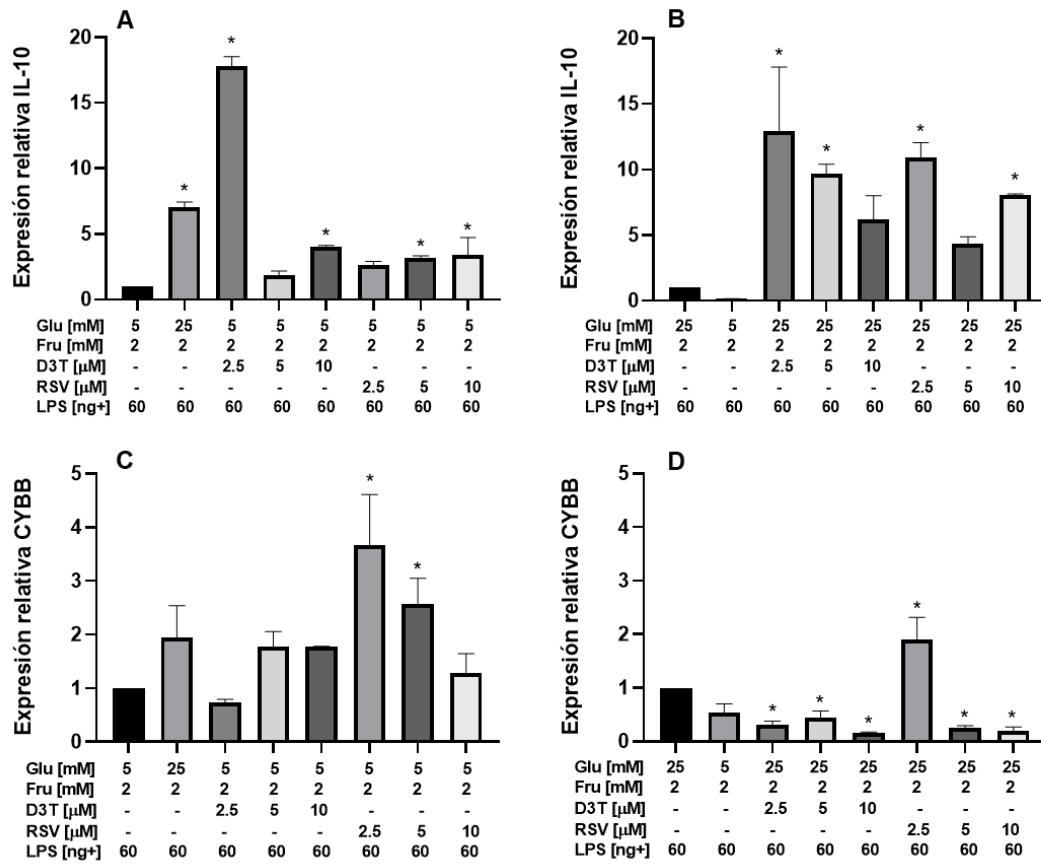
Por su parte, la evaluación en la expresión relativa de IL-10, como también del marcador molecular CYBB, bajo GE y HG con estimulación de 60 ng/mL de LPS y fructosa, arrojó resultados interesantes. Iniciando con la expresión relativa de IL-10, los resultados más sobresalientes en condiciones de GE y HG sin la adición de fructosa (Figuras 11A y 11B) se presentaron en las concentraciones con D3T, en las cuales se registraron las mayores inducciones de esta interleucina a la concentración de 5 y 10  $\mu$ M, respectivamente. Este efecto no observó con las concentraciones de RSV bajo las mismas condiciones experimentales, obteniéndose niveles relativos de expresión similares a los controles correspondientes sin adición de compuesto bioactivo. Estos efectos sobre la inducción de la expresión relativa de IL-10 se ven afectados drásticamente al suministrar fructosa en el cultivo de macrófagos.

Los macrófagos bajo GE, estimulados con LPS y fructosa, presentan un incremento significativo hasta 7.04 veces en la expresión relativa de IL-10, en comparación con el tratamiento control de HG bajo las mismas condiciones sin compuesto bioactivo (Figura 18A). Esto difiere de los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones sin estimulación de fructosa, donde este tratamiento presenta una expresión relativa similar a la del control de GE sin estimulación de fructosa ni compuesto bioactivo (Figura 11B). Por otra parte, la mayor inducción en la expresión relativa de IL-10 se presentó con D3T a 2.5  $\mu$ M, con un incremento de hasta 17.8 veces respecto al control bajo GE sin compuesto bioactivo. Así mismo, este comportamiento se

presentó nuevamente en los macrófagos bajo HG a la misma concentración de D3T 2.5  $\mu$ M, incrementándose la expresión relativa de IL-10 hasta 12.9 veces respecto al control HG sin compuesto bioactivo (Figura 18B).

Las diferentes concentraciones con RSV bajo GE aumentaron significativamente esta interleucina en hasta 3.4 veces a una concentración de 10  $\mu$ M y de hasta 10.9 veces a una concentración de 2.5  $\mu$ M de bioactivo bajo HG (Figura 18A y 18B), lo anterior en comparación a las determinaciones realizadas bajo las mismas condiciones experimentales sin estimulación con fructosa (Figura 11B), en las que no se observó algún efecto significativo por parte de las concentraciones de RSV. De manera similar, Saovieng y colaboradores (2018) reportan un aumento de la expresión relativa de IL-10 bajo condiciones de GE y suplementación con fructosa en un modelo animal de ratas. Posterior al término del periodo de administración del tratamiento con fructosa en el agua de beber se reporta un incremento de hasta 12 veces en la expresión relativa de IL-10 en secciones de músculo, en comparación con los animales a los que no se les administró fructosa. A pesar de la investigación acerca de los efectos de la fructosa en diferentes tejidos, la potencial explicación referente a este tipo de variaciones en la expresión de interleucinas relacionadas a fenómenos como la polarización se encuentran pobremente estudiadas.

Por otra parte, y de manera inicial, no se observaron disminuciones significativas en la expresión relativa del gen CYBB tanto en condiciones de GE y HG, con estimulación de LPS y sin suplementación con fructosa (Figura 11A y 11B); sin embargo, lo anterior se ve modificado al suplementar con fructosa bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 18). Bajo condiciones de HG en presencia de fructosa se registraron disminuciones importantes en la expresión relativa del gen CYBB de hasta 83.9 y 79.8 % a las concentraciones más altas de D3T y RSV, respectivamente, lo cual podría relacionarse a la polarización hacia M2 bajo esas condiciones experimentales. Estos resultados hasta donde sabemos son el primer reporte acerca del efecto de la fructosa en condiciones de hiperglicemia sobre la inducción de IL-10 y CYBB en la línea celular RAW 264.7.



*Figura 18. Expresión relativa de la citocina antiinflamatoria IL-10 y el biomarcador M1 CYBB posterior a la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglucemia, estimulada con LPS (60 ng/mL) y fructosa. A) y B) expresión relativa de IL-10 bajo GE y HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa, respectivamente; C) y D) expresión relativa de CYBB bajo GE y HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa, respectivamente. \*Indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.01$ ) en A) y C) respecto al control GE con estimulación de LPS sin compuesto bioactivo; B) y D) respecto al control HG con estimulación de LPS sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS (ng/mL).*

## **6.12 Cambios en la eficiencia de la fagocitosis mediada por estimulación con LPS bajo hiperglicemia y fructosa en macrófagos RAW 264.7 suplementados con D3T y RSV**

Para finalizar, tomando en consideración los cambios morfológicos del cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 obtenidas en la Figura 12, se optó por determinar el impacto de los diversos tratamientos en la capacidad de fagocitosis. De manera inicial, se obtuvieron datos interesantes respecto a la eficacia fagocítica de los macrófagos bajo diferentes condiciones de hiperglicemia. Se emplearon macrófagos bajo GE estimulados con LPS (60 ng/mL) sin fructosa como control positivo de la eficacia de fagocitosis, obteniendo una disminución significativa en la eficacia fagocítica respecto a las demás condiciones de hiperglicemia sin suplementación de compuestos bioactivos; por lo tanto, se aprecia una disminución de esta eficacia fagocítica de hasta 25.8 % para el control bajo HG con LPS, sin estimulación con fructosa ni compuestos bioactivos; 46.5 % para el control bajo GE con LPS, con fructosa y sin compuestos bioactivos; y, finalmente, hasta 65.6 % para el control bajo HG con LPS, con fructosa y sin compuestos bioactivos (Figura 19).

En cuanto a los tratamientos, se observa una recuperación dosis respuesta en la eficacia fagocítica de hasta 87.1 % con D3T bajo GE con LPS y fructosa en su concentración más alta (10  $\mu$ M), con respecto al control bajo GE con LPS y fructosa sin compuesto bioactivo. De manera similar, los macrófagos suplementados con RSV mostraron una recuperación de hasta 78.8 % bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 19A). Por otra parte, al incubar los macrófagos bajo HG con LPS y fructosa, las concentraciones con D3T mostraron niveles similares a los obtenidos por los macrófagos control bajo GE con LPS sin fructosa ni compuestos bioactivos, con una eficacia de hasta 98 % en su concentración más baja de 2.5  $\mu$ M; sin embargo, no pudo observarse el mismo efecto de recuperación de capacidad fagocítica en los macrófagos suplementados con RSV bajo las mismas condiciones experimentales. Por el contrario, las células presentaron disminuciones dosis dependiente hasta un 30.3 % menor de eficacia (Figura 19B), similar a lo obtenido

en el control bajo HG con LPS y estimulación con fructosa sin compuesto bioactivo. El comportamiento de los controles empleados en la determinación concuerda con lo reportado por Pavlou y colaboradores, quienes al mantener un estímulo de HG en macrófagos primarios peritoneales obtienen una disminución de aproximadamente del 33 %, respecto a los mismos macrófagos primarios bajo GE (Pavlou *et al.*, 2018).

Estos resultados coinciden con lo observado en patologías relacionadas con la inflamación, en las cuales los pacientes tienden a tener disminuida la capacidad de respuesta por parte de elementos del sistema inmunitario innato, como bien se presenta en sobre peso, obesidad y diabetes (Dekker *et al.*, 2019; Kolliniati *et al.*, 2022). Sin embargo, la recuperación de la eficacia fagocítica con la suplementación de compuestos bioactivos, como el D3T y el RSV, sugiere que es posible re establecer la capacidad fagocítica de los macrófagos afectados por condiciones de hiperglicemia. Al igual que los resultados anteriormente presentados en este estudio, es necesario continuar profundizando e indagar sobre los mecanismos que actúan en estos microambientes a fin de promover de forma más eficiente la homeostasis del tejido.

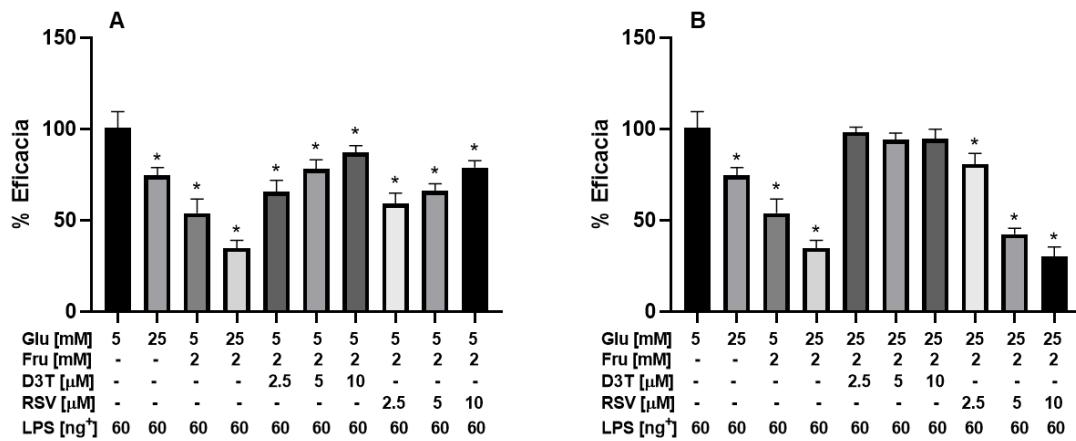


Figura 19. Cambios en la eficacia de la fagocitosis posterior a la suplementación con D3T y RSV en la línea celular RAW 264.7 bajo hiperglicemia, estimulada con LPS (60 ng/mL) y fructosa. A) porcentaje de eficacia fagocítica bajo GE con 60 ng/mL de LPS y fructosa; B) porcentaje de eficacia fagocítica bajo HG con 60 ng/mL de LPS y fructosa. \*Indica diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) respecto al control GE con estimulación de LPS sin compuesto bioactivo. +Concentración de LPS (ng/mL).

## VII. CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra las diferencias en los perfiles de expresión relativos de las interleucinas involucradas en procesos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en macrófagos RAW 264.7, así como los cambios de los mecanismos antioxidantes endógenos (GSH y CAT) y la liberación de metabolitos pro-inflamatorios (NO y MDA) en condiciones GE y HG en presencia o ausencia de fructosa, principalmente bajo el estímulo de 60 ng/mL de LPS, ya sea por D3T o RSV.

Tradicionalmente, se asume que la exposición de macrófagos a compuestos clasificados como anti-inflamatorios dará como resultado macrófagos M2 con características efectoras similares independientemente del compuesto suministrado. Los resultados de este proyecto sugieren que este punto de vista representaría un sesgo en los potenciales efectos de compuestos bioactivos, debido a que factores como la concentración de glucosa, en conjunto con otros carbohidratos como la fructosa, y elementos potencialmente reconocibles por el receptor tipo Toll 4 (TRL4) como el LPS, afectan la funcionalidad efectora de estos potenciales macrófagos M2 polarizados. Basándonos en las evaluaciones reportadas en este estudio podemos concluir que obtienen diferentes perfiles de macrófagos M2 polarizados dependiendo de un número diverso de estímulos que conforman un microambiente determinado, el cual impacta en la homeostasis celular.

En general, los resultados demuestran que los macrófagos M2 inducidos por D3T tienen una mayor capacidad para la producción de elementos anti-inflamatorios, como la IL-10, y una importante mejora de la eficacia fagocítica; mientras que, la suplementación con RSV estimula macrófagos con mayor capacidad para inhibir la expresión de elementos pro-inflamatorios como las interleucinas 1 y 6, con un impacto bajo o nulo sobre las características anti-inflamatorias.

A pesar de que la línea celular de macrófagos RAW 264.7 es un modelo clásico para la evaluación de mecanismos pro-inflamatorios resulta de gran relevancia evaluar los efectos encontrados en esta investigación en cultivos primarios de macrófagos, lo que podría generar una mejor aproximación y comprensión sobre el efecto de los compuestos bioactivos en un contexto de disfunción metabólica. Todo esto es importante a tener en cuenta para generar estrategias más efectivas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación utilizando productos naturales bioactivos donde los macrófagos juegan un papel fundamental en la promoción de estos procesos.

## VIII. REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro*. Methods Enzymol. 105;121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- Andrade, M., Frade, A. C., Guimaraes, J. B., Freitas, K. M., Lopes, M. T., Guimaraes, A. L., De Paula, A. M., Coimbra, C. C., Santos, S. H. (2014). *Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet*. Eur J Nutr. 53;1503-1510. doi:10.1007/s00394-014-0655-6.
- Arlauckas, S. P., Garren, S. B., Garris, C. S., Kohler, R. H., Oh, J., Pittet, M. J., Weissleder, R. (2018). *Arg 1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages*. Theranostic. 8;5842-5854. doi:10.7150/thno.26888.
- Arner, P., Bernard, S., Appelsved, L., Fu, K. Y., Andersson, D. P., Salehpour, M., Thorell, A., Rydén, M., Spalding, K. L. (2019). *Adipose lipid turnover and long-term changes in body weight*. Nat Med. 25;1385-1389. doi:10.1038/s41591-019-0565-5.
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., Kumar, S. S. (2016). *Role of antioxidants and natural products in inflammation*. Oxid Med Cell Longev. 2016;5276130. doi:10.1155/2016/5276130.
- Bigagli, E., Cinci, L., Paccosi, S., Parenti, A., D'Ambrosio, M., Luceri, C. (2017). *Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages*. Int Immunopharmacol. 43;147–155. doi:10.1016/j.intimp.2016.12.01.
- Camille, N. & Dealtry, G. (2018). *Regulation of M1/M2 macrophage polarization by sutherlandia frutescens via NFkB and MAPK signaling pathways*. S Afr J Bot. 116;42-61. doi:10.1016/j.sajb.2018.02.400.
- Chen, L., Chen, X. W., Huang, X., Song, B. L., Wang, Y., Wang, Y. (2019). *Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease*. Sci China Lie Sci. 62;1420-1458. doi:10.1007/s11427-019-1563-3.
- Chen, Z., Zhuo, R., Zhao, Y., Yang, L., Zhou, Y., Cheng, X., Peng, L., Jin, X., Wang, Y. (2020). *Oleoylethanolamide stabilizes atherosclerotic plaque through regulating*

*macrophage polarization via AMPK-PPAR $\alpha$  pathway.* Biochem Biophys Res Commun. 524;308-316. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.103.

Chung, J. H., Manganiello, V., Dyck, J. R. B. (2012). *Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications.* Trends Cell Biol. 22;546–554. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.004.

Chung, S., Ranjan, R., Lee, Y. G., Park, G. Y., Karpurapu, M., Deng, J., Xiao, L., Kim, J. Y., Unterman, T. G., Christman, J. W. (2015). *Distinct role of FoxO1 in M-CSF-and GM-CSF-differentiated macrophages contributes LPS-mediated IL-10: implication in hyperglycemia.* J Leukoc Biol. 97;327-339. doi:10.1189/jlb.3A0514-251R.

Coussens L. M. & Werb, Z. (2002). *Inflammation and cancer.* Nature. 6917;860-867. doi:10.1038/nature01322.

Cuadrado, A., Manda, G., Hassan, A., Alcaraz, M. J., Barbas, C. (2018). *Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: A systems medicine approach.* Pharmacol Rev. 70;348–383. doi:10.1124/pr.117.014753.

Cui, F., Sequeira, S. B., Huang, Z., Shang, G., Cui, Q., Yang, X. (2020). *Bromosulfophthalein suppresses inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophages.* Immunopharmacol Immunotoxicol. 42;456-463. doi:10.1080/08923973.2020.1808985.

De Leon, J. A. D. & Borges, C. R. (2020). *Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay.* J Vis Exp. 159;e61122. doi:10.3791/61122.

DeBerardinis, R. J. & Thompson, C. B. (2012). *Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?* Cell. 148;1132-1144. doi:10.1016/j.cell.2012.02.032.

Dekker, A. D., Davis, F. M., Kunkel, S. L., Gallagher, K. A. (2019). *Targeting epigenetic mechanisms in diabetic wound healing.* Transl Res. 204;39-50. doi:10.1016/j.trsl.2018.10.001.

Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V., Canning, P. (2017). *Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants.* Arch Biochem Biophys. 617;84-93. doi:10.1016/j.abb.2016.08.005.

Diskin, C. & McDermott, E. M. (2018). *Metabolic modulation in macrophage effector function.* Front Immunol. 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00270.

Dissanayake, W. C., Oh, J. K., Sorrenson, B., Shepherd, P. R. (2021). *Glucose regulates expression of pro-inflammatory genes, IL-1 and IL-12, through a mechanism involving hexosamine biosynthesis pathway-dependent regulation of  $\alpha$ -E catenin*. Biosci Rep. 41;BSR20211066. doi:10.1042/BSR20211066.

Dong, Q., Yang, B., Han, J. G., Zhang, M. M., Liu, W., Zhang, X., Yu, H. L., Liu, Z. G., Zhang, S. H., Li, T., Wu, D. D., Ji, X. Y., Duan, S. F. (2019). *A novel hydrogen sulfide-releasing donor, HA-ADT, suppresses the growth of human breast cancer cells through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways*. Cancer Lett. 445;60-72. doi:10.1016/j.canlet.2019.04.031.

Egeblad, M., Nakasone, E. S., Werb, Z. (2010). *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism*. Dev Cell. 18;884-901. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012.

Engström, A., Erlandsson, A., Delbro, D., Wijkander, J. (2014). *Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2*. Int J Oncol. 44;385–392. doi:10.3892/ijo.2013.2203.

Farruggia, C., Kim, M. B., Bae, M., Lee, Y., Pham, T. X., Yang, Y., Han, M. J., Park, Y. K., Lee, J. Y. (2018). *Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners*. J Nutr Biochem. 62;202-209. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.09.005.

Figueiredo, R. D. A., Ortega, A. C., Gonzalez-Maldonado, L. A., Castro, R. D. D., Ávila-Campos, M. J., Rossa-Junior, C., Aquino, S. G. D. (2020). *Perillyl alcohol has antibacterial effects and reduces ROS production in macrophages*. J Appl Oral Sci. 28;e20190519. doi:10.1590/1678-7757-2019-0519.

Galván-Peña, S. & O'Neil, L. A. J. (2014). *Metabolic reprogramming in macrophage polarization*. Front Immunol. 2;420. doi:10.3389/fimmu.2014.00420.

Gambaro, S. E., Zubiría, M. G., Portales, A. E., Rey, M. A., Rumbo, M., Giovambattista, A. (2018). *M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet*. J Nutr Biochem. 61;173-182. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.08.004.

Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., Alizadeh, A. A. (2015). *The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers*. Nat Med. 21;938-945. doi:10.1038/nm.3909.

Gerrick, K. Y., Gerrick, E. R., Gupta, A., Wheelan, S. J., Yegnasubramanian, S., Jaffee, E. M. (2018). *Transcriptional profiling identifies novel regulators of macrophage polarization.* PloS one. 13;e0208602. doi:10.1371/journal.pone.0208602.

Giugliano, D., Ceriello, A., Esposito, K. (2008). *Glucose metabolism and hyperglycemia.* Am J Clin Nutr. 87;217s-222s. doi:10.1093/ajcn/87.1.217s.

Glorieux, C. & Calderon, P. B. (2017). *Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach.* Biol Chem. 398;1095-1108. doi:10.1515/hsz-2017-0131.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. (2010). *Immunity, inflammation, and cancer.* Cell. 140;883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.

Güemes, M., Rahman, S. A., Hussain, K. (2015). *What is a normal blood glucose?* ADC. 101;596-574. Doi:10-1136/archdischild-2015-308336.

Hagerman, A. E., Ken, M. R., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L. (1998). *High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants.* J Agric Food Chem. 46 (5);1887-1892. doi:10.1021/jf970975.

Herman, M. A. & Birnbaum, M. J. (2021). *Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease.* Cell Metab. 33;2329-2354. doi:10.1016/j.cmet.2021.09.010.

Herman, M. A. & Kahn, B. B. (2006). *Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony.* J Clin Investig. 116;1767-1775. doi:10.1172/JCI29027.

Hotamisligil, G.S. (2006). *Inflammation and metabolic disorders.* Nature. 444;860-867. doi:10.1038/nature05485.

Hu, W., Ru, Z., Zhou, Y., Xiao, W., Sun, R., Zhang, S., Gao, Y., Li, X., Zhang, X., Yang, H. (2019). *Lung cancer-derived extracellular vesicles induced myotube atrophy and adipocyte lipolysis via the extracellular IL-6-mediated STAT3 pathway.* BBA-Mol Cell Biol L. 1864;1091-1102. doi:10.1016/j.bbalip.2019.04.006.

Huang, X., Li, X., Xie, M., Huang, Z., Huang, Y., Wu, G., Peng, Z., Sun, Y., Ming, Q., Liu, Y., Chen, J., Xu, S. (2019). *Resveratrol: Review on its discovery, pharmacokinetics and anti-leukemia effects.* Chem-Biol Interact. doi:10.1016/j.cbi.2019.04.001.

- Hussain, S. P., Hofseth, L. J., Harris, C. C. (2003). *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer. 3;276-285. doi:10.1038/nrc1046.
- Iizuka, K. (2023). *Recent progress on fructose metabolism-Chrebp, fructolysis, and polyol pathway*. Nutrients. 15;1778. doi:10.3390/nu15071778.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. (1999). *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes. 13;76-78. doi:10.1101/gad.13.1.76.
- Jayakumar, T., Wu, M. P., Sheu, J. R., Hsia, C. W., Bhavan, P. S., Manubolu, M., Chung, C. L., Hsia, C. H. (2021). *Involvement of antioxidant defenses and NF- $\kappa$ B/ERK signaling in anti-inflammatory effects of pterostilbene, a natural analogue of resveratrol*. Appl Sci. 11;4666. doi:10.3390/app11104666.
- Jung, S., Bae, H., Song, W. S., Jang, C. (2022). *Dietary fructose and fructose-induced pathologies*. Annu Rev Nutr. 42;45-66. doi:10.1146/annurev-nutr-062220-025831.
- Kang, B., Kim, C. Y., Hwang, J., Suh, H. J., Choi, H. S. (2019). *Brassinin, a phytoalexin in cruciferous vegetables, suppresses obesity-induced inflammatory responses through the Nrf2-HO-1 signaling pathway in an adipocyte-macrophage co-culture system*. Phytother Res. 33;1426–1437. doi:10.1002/ptr.6333.
- Kawai, T., Autieri, M. V., Scalia, R. (2021). *Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity*. Am J Physiol Cell. 320;C375-C391. doi:10.1152/ajpcell.00379.2020.
- Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M. E., Cuperlovic-Culf, M. (2020). *Role of glutathione in cancer: from mechanisms to therapies*. Biomolecules. 10;1429. doi:10.3390/biom10101429.
- Kolliniati, O., Ieronymaki, E., Vergadi, E., Tsatsanis, C. (2022). *Metabolic regulation of macrophage activation*. J Innate Immun. 14;51-68. doi:10.1159/000516780.
- Kopacz, A., Kloska, D., Forman, H. J., Jozkowicz, A., Grochot-Przeczek, A. (2020). *Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1*. Free Radic Biol Med. 157;63–74. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.023.
- Kuo, P. C., Brown, D. A., Scofield, B. A., Yu, I. C., Chang, F. L., Wang, P. Y., Yen, J. H. (2016). *3H-1,2-dithiole-3-thione as a novel therapeutic agent for the treatment*

of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 57;173-186. doi:10.1016/j.bbi.2016.03.015.

Li, C., Xu, M. M., Wang, K., Adler, A. J., Vella, A. T., Zhou, B. (2018). *Macrophage polarization and meta-inflammation.* *Transl Res.* 191;29-44. doi:10.1016/j.trsl.2017.10.004.

Li, J., Wu, H., Liu, Y., Yang, L. (2019). *High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR.* *Exp Anim.* 69;326-335. doi:10.1538/expanim.19-0148.

Lin, X. & Li, H. (2021). *Obesity: Epidemiology, pathophysiology, and therapeutics.* *Front Endocrinol.* 6:12:706978. doi:10.3389/fendo.2021.706978.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. (2008). *Cancer-related inflammation.* *Nature.* 454;436-444. doi:10.1038/nature07205.

Medzhitov, R. (2008). *Origin and physiological roles of inflammation.* *Nature.* 454;428-45. doi:10.1038/nature07201.

Meizlish, M. L., Franklin, R. A., Zhou, X., Medzhitov, R. (2021). *Tissue homeostasis and inflammation.* *Annu Rev Immunol.* 39;557-581. doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053734.

Menegon, S., Columbano, A., Giordano, S. (2016). *The dual roles of Nrf2 in cancer.* *Trends Mol Med.* 22;578-593. doi:10.1016/j.molmed.2016.05.002.

Miao, L., Shen, X., Whiteman, M., Xin, H., Shen, Y., Xin, X., Moore, P. K., Zhu, Y. Z. (2016). *Hydrogen sulfide mitigates myocardial infarction via promotion of mitochondrial biogenesis-dependent M2 polarization of macrophages.* *Antioxidants Redox Signal.* 25;268-281. doi:10.1089/ars.2015.6577.

Mohammadi, A., Blesso, C. N., Barreto, G. E., Banach, M., Majeed, M., Sahebkar, A. (2019). *Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent.* *J Nutr Biochem.* 66;1-16. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.12.005.

Mosser, D. M. & Edwards, J. P. (2008). *Exploring the full spectrum of macrophage activation.* *Nat Rev Immunol.* 8;958-969. doi:10.1038/nri2448.

Nagy, T., Fisi, V., Frank, D., Kátai, E., Nagy, Z., Miseta, A. (2019). *Hyperglycemia-induced aberrant cell proliferation; a metabolic challenge mediated by protein O-GlcNAc modification.* *Cells.* 28;999. doi:10.3390/cells8090999.

- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., Ignarro, L. J. (2013). *Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights*. J Am Coll Cardiol. 62;89-95. doi:10.1016/j.jacc.2013.03.070.
- Noy, R. & Pollard, J. W. (2014). *Tumor-associated macrophages: from mechanism to therapy*. Immunity. 41;49-61. doi:10.1016/j.jimmuni.2014.06.010.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. (2009). *The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 4;a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., Ley, K. (2020). *Corrigendum: Macrophage polarization: Different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages*. Front Immunol. 11;234. doi:10.3389/fimmu.2020.00234.
- Palacz-Wrobel, M., Borkowska, P., Paul-Samojedny, M., Kowalczyk, M., Fila-Danilow, A., Suchanek-Raif, R., Kowalski, J. (2017). *Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 (IL-10) in RAW 26.7 macrophages*. Biomed Pharmacother. 93;1205-1212. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.054.
- Palm, W. & Thompson, C. B. (2017). *Nutrient acquisition strategies of mammalian cells*. Nature. 546;234-242. doi:10.1038/nature22379.
- Pan, J., Zhou, L., Zhang, C., Xu, Q., Sun. (2022). *Targeting protein phosphatase for the treatment of inflammation-related diseases: From Signaling to therapy*. Signal Transduct Target Ther. 1;177. doi:10.1038/s4139-022-01038-3.
- Pararasa, C., Bailey, C. J., Griffiths, H. R. (2015). *Ageing, adipose tissue, fatty acids and inflammation*. Biogerontology. 16;235-248. doi:10.1007/s10522-014-9536-x.
- Pavlou, S., Lindsay, J., Ingram, R., Xu, H., Chen, M. (2018). *Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity*. BMC Immunol. 19;24. doi:10.1186/s12865-018-0261-0.
- Pérez, L. M., Pareja-Galeano, H., Sanchis-Gomar, F., Emanuele, E., Lucia, A., Gálvez, B. G. (2016). *'Adipaging': ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue*. J Physiol. 594;3187-3207. doi:10.1113/JP271691.

- Poulsen. M., Jorgensen, J.O., Jessen, N. B., Richelson, Pedersen, S. B. (2013). *Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1290:74–82. doi:10.1111/nyas.12141.
- Qiu, P., Man, S., Li, J., Liu, J., Zhang, L., Yu, P., Gao, W. (2016). *Overdose intake of curcumin initiates the unbalanced state of bodies*. J. Agric Food Chem. 64:2765–2771. doi:10.1021/acs.jafc.6b00053.
- Qureshi, A. A., Guan, X. Q., Reis, J. C., Papasian, C. J., Jabre, S., Morrison, D. C., Qureshi, N. (2012). *Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor*. Lipids Health Dis. 11:1-17. doi:10.1186/1476-511X-11-76.
- Rada, E., Marzal, M., Aranzazu, N., Convit, J. (2003). *Incremento de óxido nítrico en el suero y sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes con la enfermedad de Hansen en estado reacional tipo II*. Rev Invest Clin. 44:129–136. ISSN:0535-5133.
- Rajasingh, J., Bord, E., Luedemann, C., Asai, J., Hamada, H., Thorne, T., Qin, G., Goukassian, D., Zhu, Y., Losordo, D. W. (2006). *IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression*. Faseb J. 20:2112-2114. doi:10.1096/fj.06-6084fje.
- Rakotoarivelo, V., Variya, B., Ilangumaran, S., Langlois, M. F., Ramanathan, S. (2018). *Inflammation in human adipose tissues-shades of gray, rather than white and brown*. Cytokine Growth Factor Rev. 44:28-37. doi:10.1016/j.cytofr.2018.10.001.
- Rathinam, V. A. K. & Chan, F. K. (2018). *Inflammasome, inflammation, and tissue homeostasis*. Trends Mol Med. 24,304-318. doi:10.1016/j.molmed.2018.01.004.
- Robbins, R. J. (2003). *Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology*. J Agric Food Chem. 51 (10); 2866-2887. doi:10.1021/jf026182t.
- Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U. (2003). *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. J Biol Chem. 278:45777-45784. doi:10.1074/jbc.M301977200.
- Saleh, H. A., Ramdan, E., Elmazar, M. M., Azzazy, H. M., Abdelnaser, A. (2021). *Comparing the protective effects of resveratrol, curcumin and sulforaphane against*

*LPS/IFN- $\gamma$ -mediated inflammation in doxorubicin-treated macrophages.* Sci Rep. 11;1-16. doi:10.1038/s41598-020-80804-1.

Saovieng, S., Wu, J., Huang, C. Y., Kao, C. L., Higgins, M. F., Chuanchaiyakul, R., Kuo, C. H. (2018). *Deep ocean minerals minimize eccentric exercise-induced inflammatory response of rat skeletal muscle.* Front Physiol. 28;1351. doi:10.3389/fphys.2018.01351.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., Sahebkar, A. (2018). *Macrophage plasticity, polarization, and function in health disease.* J Cell Physiol. 233;6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429.

Shi, X., Pan, S., Li, Y., Ma, W., Wang, H., Xu, C., Li, L. (2020). *Xanthoplanine attenuates macrophage polarization towards M1 and inflammation response via disruption of Crkl-STAT5 complex.* Arch Biochem Biophys. 15;108325. doi:10.1016/j.abb.2020.108325.

Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou, J., Shao, C., Wang, Y. (2018). *Immunorregulatory mechanism of mesenchymal stem and stromal cells in inflammation diseases.* Nat Rev Nephrol. 8,493-507. doi:10.1038/s41581-018-0023-5.

Song, M., Kellum, J. A., Kaldas, H., Fink, M. P. (2004). *Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells.* J Pharmacol Exp Ther. 308;307-316. doi:10.1124/jpet.103.056622.

Spruss, A., Kanuri, G., Uebel, K., Bischoff, S. C., Bergheim, I. (2011). *Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice.* ARS. 14;2121-2135. doi:10.1089/ars.2010.3263.

Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J. (2013). *Capítulo 16: Glucólisis y gluconeogénesis. Bioquímica 7<sup>a</sup> edición.* Reverté. Barcelona, España. 453-491.

Studentsova, V., Mora, K. M., Glasner, M. F., Buckley, M. R., Loiselle, A. E. (2018). *Obesity/type II diabetes promotes function-limiting changes in murine tendons that are not reversed by restoring normal metabolic function.* Sci Rep. 8;9218. doi:10.1038/s41598-018-27634-4.

Sun, Y., Diao, F., Niu, Y., Li, X., Zhou, H., Mei, Q., Li, Y. (2020). *Apple polysaccharide prevents from colitis-associated carcinogenesis through regulating*

*macrophage polarization.* Int J Biol Macromol. 161;704-711. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.121.

Tan, Q., Huang, Q., Ling, M. Y., Mao, K. M., Yang, G. H., Luo, P., Ma, G. Z., Mei, P. Y., Jin, Y. (2018). *Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease.* Cytokine Growth F R. 44;18 – 27. doi:10.1016/j.cytoogr.2018.11.001.

Tanase, D. M., Gosav, E. M., Anton, M. I., Floria, M., Seritean-Isac, P. N., Hurjui, L. L., Tarniceriu, C. C., Costea, C. F., Ciocoiu, M., Rezus, C. (2022). *Oxidative stress and NRF2/KEAP1/ARE pathway in diabetic kidney disease (DKD): New perspectives.* Biomolecules. 12;1227. doi:10.3390/biom12091227.

Tietze F. (1969). *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.* Anal Biochem. 27;502–522. doi:10.1016/0003-2697(69)90064-5.

Todoric, J., Di Caro, G., Reibe, S., Henstridge, D. C., Green, C. R., Vrbanac, A., Ceteci, F., Conche, C., McNulty, R., Shalapour, S., Taniguchi, K., Meikle, P. J., Watrous, J. D., Moranchel, R., Najhawan, M., Jain, M., Liu, X., Kisseeleva, T., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Knight, R., Greten, F. R., Lau, L. F., Metallo, C. M., Febbraio, M. A., Karin, M. (2020). *Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation.* Nat Metab. 10;1034-1045. doi:10.1038/s42255-020-0261-2.

Tong, K. I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S., Yamamoto, M. (2007). *Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response.* Mol Cell Biol. 27:7511–7521. doi:10.1128/MCB.00753-07.

Vasileva, L. V., Marchev, A. S., Georgiev, M. I. (2018). *Causes and solutions to “globesity”; the new fat alarming global epidemic.* Food Chem Toxicol. 121;173-193. doi:10.1016/j.fct.2018.08.071.

Vasileva, L. V., Savova, M. S., Amirova, K. M., Dinkova-Kostova, A. T., Georgiev, M. I. (2020). *Obesity and NRF2-mediated cytoprotection: where is the missing link?* Pharmacol Res. 156;104760. doi:10.1016/j.phrs.2020.10760.

Venter, G., Oerlemans, F. T., Wijers, M., Willemse, M., Fransen, J. A., Wieringa, B. (2014). *Glucose controls morphodynamics of LPS-stimulated macrophages.* PloS one. 9;e96786. doi:10.1371/journal.pone.0096786.

- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., Gavaldá-Navarro, A., Giralt, M. (2018). *Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology*. *Cell Metab.* 27;954-961. doi:10.1016/j.cmet.2018.04.006.
- Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., Castegna, A. (2019). *The metabolic signature of macrophage responses*. *Front Immunol.* 3;1462. doi:10.3389/fimmu.2019.01462.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., Boyd, M. R. (1991). *Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production*. *Cancer Res.* 51;2515–2520. PMID:2021931.
- Wang, Y., Xu, Y., Zhang, P., Ruan, W., Zhang, L., Yuan, S., Pang, T., Jia, A. Q. (2018). *Smiglaside A ameliorates LPS-induced acute lung injury by modulating macrophage polarization via AMPK-PPAR $\gamma$  pathway*. *Biochem Pharmacol.* 156;385-395. doi:10.1016/j.bcp.2018.09.002.
- WHO. (2023). Consultado en: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imrdetails/2380#:~:text=The%20expected%20values%20for%20normal,an%20monitoring%20glycemia%20are%20recommended>. el 01 de noviembre de 2023.
- Yamamoto, M., Kensler, T. W., Motohashi, H. (2018). *The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis*. *Physiol Rev.* 98;1169-1203. doi:10.1152/physrev.00023.2017.
- Yu, B., Qin, S. Y., Hu, B. I., Qin, Q. Y., Jiang, H. X., Luo, W. (2019). *Resveratrol improves CCL4-induced liver fibrosis in mouse by upregulating endogenous IL-10 to reprogramme macrophages phenotype from M(LPS) to M(IL-4)*. *Biomed Pharmacother.* 117;109110. doi:10.1016/j.biopha.2019.109110.
- Yu, B., Qin, S. Y., Hu, B. L., Qin, Q. Y., Jiang, H. X., Luo, W. (2019). *Resveratrol improves CCL4-induced liver fibrosis in mouse by upregulating endogenous IL-10 to reprogramme macrophages phenotype from M(LPS) to M(IL-4)*. *Biomed Pharmacother.* 117;109110. doi:10.1016/j.biopha.2019.109110.
- Zhang, X. Y., Liu, Y., He, T., Yang, T. T., Wu, J., Cianflone, K., Lu, H. L. (2018). *Anaphylatoxin C5a induces inflammation and reduces insulin sensitivity by activating TRL4/NF- $\kappa$ B/PI3K signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes*. *Biomed Pharmacother.* 103;955-964. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.057.

Zhao, M., Li, F., Jian, Y., Wang, X., Yang, H., Wang, J., Su, J., Lu, X., Xi, M., Wen, A. (2020). *Salvianolic acid B regulates macrophage polarization in ischemic/reperfused hearts by inhibiting mTORC1-induced glycolysis*. Eur J Pharmacol. 871;172916. doi:10.1016/j.ejphar.2020.172916.

Zhou, C., Zhang, X., Ruan, C. C., Cheang, W. S. (2021). *Two methoxy derivatives of resveratrol, 3, 3', 4, 5'-tetramethoxy-trans-stilbene and 3, 4', 5-trimethoxy-trans-stilbene, suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through inactivation of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in RAW 264.7 cells*. Chin Med. 16;1-14. doi:10.1186/s13020-021-00480-9.

Zhou, X., Franklin, R. A., Adler, M., Jacox, J. B., Bailis, W., Shyer, J. A., Flavell, R. A., Mayo, A., Alon, U., Medzhitov, R. (2018). *Circuit design features of a stable two-cell system*. Cell. 17;744-757. doi:10.1016/j.cell.2018.01.015.

Zhu, H., Bui, A., Santo, A., Li, Y. R. (2022). *3H-1, 2-dithiole-3-thione suppresses LPS-induced proinflammatory responses in macrophages: potential involvement of antioxidant induction, NF- $\kappa$ B, and Nrf2*. Mol Cell Biochem. 477;1499-1506. doi:10.1007/s11010-021-04331-x.

Zhu, H., Jia, Z., Zhang, L., Yamamoto, M., Misra, H. P., Trush, M. A., Li, Y. (2008). *Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress*. Exp Biol Med (Maywood). 233;463-474. doi:10.3181/0711-RM-304.

Zhu, L., Yang, B., Ma, D., Wang, L., Duan, W. (2020). *Hydrogen sulfide, adipose tissue and diabetes mellitus*. Diabetes Metab Syndr Obes. 13;1873-1886. doi:10.2147/DMSO.S249605.

Zhu, L., Zhao, Q., Yang, T., Ding, W., Zhao, Y. (2014). *Cellular metabolism and macrophage functional polarization*. Int Rev Immunol. 34;82-100. doi:10.3109/08830185.2014.969421.

Zhu, Y., Fan, S., Lu, Y., Wei, Y., Tang, J., Yang, Y., Li, F., Chen, Q., Zheng, J., Liu, X. (2019). *Quercetin confers protection of murine sepsis by inducing macrophage M2 polarization via the TRPM2 dependent calcium influx and AMPK/ATF3 activation*. J Funct Foods. 56;1-13. doi:10.1016/j.jff.2019.03.001.