



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE ALTA GLUCOSA E INSULINA SOBRE EL
FENÓMENO DE POLARIZACIÓN *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS SUPLEMENTADOS CON
RESVERATROL”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANAHI LANDIN GÓMEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2025.

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 licenciante 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 licenciante.



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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE ALTA GLUCOSA E INSULINA SOBRE EL
FENÓMENO DE POLARIZACIÓN *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS SUPLEMENTADOS CON
RESVERATROL”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANAHI LANDIN GÓMEZ

DIRIGIDA POR

Dra. Minerva Ramos Gómez

SINODALES

Dra. Minerva Ramos Gómez
DIRECTOR

Dr. Josué Manríquez Núñez
SECRETARIO

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
SINODAL

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Macrófagos	3
2.1.1 Receptores de membrana en macrófagos	4
2.2 Inflamación.....	6
2.3 Polarización de macrófagos	8
2.3.1 Macrófagos proinflamatorios (M1)	9
2.3.2 Macrófagos antiinflamatorios (M2)	10
2.4 Metabolismo de glucosa en la polarización de macrófagos	17
2.4.1 Señalización de insulina en la activación de macrófagos	18
2.5 Macrófagos en el desarrollo de la inflamación.....	20
2.5.1 Obesidad	20
2.6 Resveratrol.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Cultivo celular	27
5.2 Ensayos de viabilidad celular	27
5.2.1 Ensayo MTT	27
5.2.2 Cuantificación de proteína total por BCA	28
5.3 Cuantificación de nitritos por el reactivo de Griess	29
5.4 Determinación de GSH total.....	29
5.5 Ensayo de TBARS.....	30
5.6 Aislamiento de RNA y análisis por qPCR	31
5.7 Análisis estadístico	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Prueba de viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar y glucosa alta en presencia de insulina y suplementados con resveratrol	34
6.2 Cuantificación de proteína por BCA en cultivos de macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar y glucosa alta en presencia de insulina alta y suplementados con resveratrol	37

6.3 Variación en la producción de óxido nítrico en cultivo de macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar y glucosa alta en presencia de insulina alta y suplementados con resveratrol	40
6.4 Efecto del estímulo sostenido de glucosa e insulina alta en cultivo de macrófagos RAW 264.7 suplementados con resveratrol sobre el estrés oxidativo (GSH).....	43
6.5 Efecto del estímulo sostenido de glucosa e insulina elevadas en cultivo de macrófagos RAW 264.7 suplementados con resveratrol sobre la peroxidación lipídica (MDA)	48
6.6 Inducción de marcadores moleculares del fenotipo M2 (IL-10) y M1 (IL-6) por RSV en macrófagos RAW 264.7 en condiciones de hiperglucemia y suplementados con insulina alta	50
VII. CONCLUSIÓN.....	58
VIII. BIBLIOGRAFÍA	59
IX. ANEXOS.....	73
9.1 Condiciones de cultivo de los macrófagos.....	73
9.2 Cambio de medio para cultivo adherente	73
9.3 Cosecha para transferencia y procedimientos experimentales	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Citocinas proinflamatorias liberadas por macrófagos M1 y sus funciones.....	12
2. Polarización de macrófagos mediante suplementación con compuestos fenólicos.....	15
3. Secuencias de los iniciadores para el análisis de la expresión relativa de genes relacionados al fenómeno de polarización	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Activación y funciones de macrófagos M1 y M2	10
2. Fenotipo antiinflamatorio y proinflamatorio de adipocitos	21
3. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre la viabilidad de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV por el ensayo MTT.....	35
4. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre el contenido de proteína en la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV por el método de BCA.....	38
5. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre la cuantificación de óxido nítrico en el medio de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV.....	43
6. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre el contenido intracelular de GSH total de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV.....	44
7. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre el contenido de MDA en el medio de cultivo de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV.....	49
8. Expresión relativa del gen proinflamatorio IL-6 en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación sostenida (7 días) con altas concentraciones de glucosa e insulina y suplementada con RSV	52

9. Expresión relativa del gen antiinflamatorio IL-10 en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación sostenida (7 días) con altas concentraciones de glucosa e insulina y suplementada con RSV	53
--	----

RESUMEN

La polarización de los macrófagos está relacionada con el estrés oxidativo y la progresión de la inflamación crónica, procesos que contribuyen al desarrollo de alteraciones metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina. Ante ello, se ha propuesto el uso de compuestos bioactivos, como el resveratrol (RSV), por su potencial para inducir una polarización antiinflamatoria en macrófagos. No obstante, son escasos los estudios que evalúan su efecto en modelos celulares expuestos a hiperglucemia sostenida y concentraciones elevadas de insulina, condiciones que simulan el microambiente metabólico característico de enfermedades como la obesidad. Con base en lo anterior, se cultivaron macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar (5 mM) o alta (25 y 30 mM), en presencia de insulina (10 μ g/mL), hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, las células se incubaron por 24 h con RSV (10 μ M) y se recolectaron las muestras para los distintos ensayos (GSH, NO, TBARS y amplificación de los genes de IL-6 e IL-10). Bajo las distintas condiciones evaluadas se observó un aumento en la viabilidad de los macrófagos; no obstante, se registró una disminución de la proteína total para 25 y 30 mM + INS + RSV. La producción de NO aumentó en los macrófagos incubados con 25 mM, 30 mM y 30 mM + INS; mientras que, los niveles de NO disminuyeron únicamente para macrófagos con glucosa 25 mM + INS + RSV y se normalizaron para los macrófagos en 25 mM + INS y 30 mM + INS + RSV, respecto al control 5 mM. Por otro lado, los valores de MDA se incrementaron en todas las condiciones evaluadas comparadas con el control 5 mM. Como mecanismo de defensa, la concentración de GSH aumentó en los macrófagos bajo las condiciones de 30 mM y 30 mM + INS. Por el contrario, la expresión relativa del gen de la IL-6 aumentó significativamente para todas las condiciones, excepto para los macrófagos en 25 mM; mientras que, la expresión de el gen de la IL-10 no presentó ningún aumento significativo en ninguna de las condiciones planteadas incluso con la adición de RSV. En general, los resultados obtenidos indican que el mantenimiento de un estado proinflamatorio crónico de bajo grado causado por hiperglucemia e hiperinsulinemia deriva en el aumento de factores proinflamatorios como NO, MDA y aumento en la expresión relativa del gen proinflamatorio IL-6 con una importante resistencia al efecto antiinflamatorio del RSV, particularmente para los macrófagos en 30 mM de glucosa.

Palabras clave: Macrófagos, hiperglucemia, insulina, resveratrol, polarización de macrófagos, inflamación.

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que supone un riesgo para la salud” afectando a millones de personas alrededor del mundo y poniendo en riesgo su salud y calidad de vida. La obesidad promueve un estado de inflamación crónica de bajo grado que con el tiempo deriva en diversos trastornos metabólicos como la resistencia a insulina, la diabetes tipo 2 (DT2), las enfermedades cardiovasculares y el hígado graso no alcohólico (EHGNA), entre otras. Este fenómeno multifactorial y complejo que combina factores genéticos, culturales y psicológicos representa un importante problema de salud pública, ya que es una de las enfermedades no transmisibles con más prevalencia y que ha ido en aumento en las últimas décadas. En México, más del 75 % de las personas adultas y alrededor del 36 % de infantes se ven afectados por el sobrepeso y la obesidad y, de acuerdo a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en los próximos 30 años nuestro país se enfrentará a una reducción de más de 4 años en la esperanza de vida debido a las enfermedades relacionadas con la obesidad.

En la obesidad, el tejido adiposo blanco es principal tejido involucrado en el desarrollo de la inflamación crónica de bajo grado, como consecuencia de la activación de los macrófagos y la liberación de factores proinflamatorios, lo que a su vez provoca la infiltración de más monocitos, los cuales que maduran en macrófagos para eliminar las células necróticas. Este proceso da inicio a un círculo vicioso de inflamación, muerte celular y desequilibrio metabólico, debido a la producción sostenida de dichos factores proinflamatorios. Además, los macrófagos presentes en el tejido adiposo tienen la capacidad de alternar entre el fenotipo proinflamatorio M1 y antiinflamatorio M2, en función de los estímulos presentes en su microambiente, como la disponibilidad de carbohidratos que favorecen determinadas vías metabólicas o el tipo de citocinas secretadas. En personas con obesidad se ha observado que la inflamación del tejido adiposo se asocia con un cambio en la proporción de los macrófagos M2 a M1, lo que contribuye al mantenimiento del estado inflamatorio.

Actualmente, existe un gran interés en la investigación de compuestos naturales bioactivos con la capacidad de modular los procesos inflamatorios y oxidativos que favorecen la aparición y progresión de diversas patologías crónicas asociadas a la inflamación. Son de particular interés los polifenoles de la dieta, como el resveratrol (RSV) estudiado en células RAW 264.7, por la amplia gama de efectos benéficos que se le han atribuido, entre los que se incluye su capacidad para inhibir NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y, en consecuencia, disminuir la síntesis de factores proinflamatorios inducidos por este factor. En este estudio se evaluó particularmente la expresión de dos genes IL-6 e IL-10, considerados indicadores del estado de polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2, respectivamente. Estudios previos publicados por Bouzazi y col. (2023) y Manríquez y col. (2023) han empleado macrófagos RAW 264.7 activados con LPS y suplementados con compuestos bioactivos, con el objetivo de analizar su efecto sobre la polarización usando IL-10 como marcador para M2 e IL-6 como marcador para la polarización M1.

A pesar de los numerosos estudios sobre el resveratrol (RSV), la información disponible sobre sus posibles efectos en condiciones hiperglucémicas es aún limitada. En este sentido, se ha reportado que en personas sanas el nivel de glucosa en sangre oscila alrededor de 4.7-6.3 mM y en personas con obesidad el nivel de glucosa se estima igual o mayor a 21.1 mM y en presencia de niveles altos de insulina, como las utilizadas en este estudio. Con lo anterior, se buscó generar condiciones que simulen las condiciones metabólicas de un individuo con una alta ingesta calórica, con el propósito de aproximarse de manera más precisa al microambiente característico de la disfunción metabólica. Esto permitiría una evaluación más adecuada del estado de polarización que podrían adoptar los macrófagos bajo dichas condiciones.

II. ANTECEDENTES

2.1. Macrófagos

Los macrófagos, descritos por primera vez en 1833 por Elia Metchnikoff, son células pertenecientes al sistema inmunitario innato que están ampliamente distribuidas en los diferentes tejidos; por ejemplo, los macrófagos alveolares localizados en los alvéolos pulmonares, las células de Kupffer en el hígado, la microglía en el sistema nervioso central y las células de Langerhans en la piel (Mase y col., 2021). Los macrófagos provienen principalmente de dos fuentes, aquellos residentes de tejido los cuales se originan a partir de células progenitoras del saco vitelino (progenitores eritromieloides) y aquellos diferenciados a partir de monocitos en circulación derivados de células madre hematopoyéticas en médula ósea (Wang y col., 2019).

Estas poblaciones heterogéneas de macrófagos desempeñan funciones importantes en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como la defensa del huésped, la homeostasis, la remodelación de tejidos, los procesos de inflamación aguda y crónica en los diferentes tejidos, entre otros. Por ejemplo, la microglía en un adulto sano se presenta como pequeños cuerpos celulares redondos con extensas ramificaciones que le permiten examinar continuamente el entorno inmediato y tras la detección de una alteración, como lo sería una sinapsis dañada o una proteína mal plegada, la microglía retrae sus ramificaciones pasando a un estado activado en el cual secreta citocinas proinflamatorias y aumenta la actividad fagocítica (Maguire y col. 2022).

Los macrófagos alveolares, ubicados en el parénquima pulmonar distal, se encargan de limpiar las vías respiratorias de microorganismos, células muertas y otras partículas transportadas por el aire mediante fagocitosis, además de tener importantes funciones en el recambio de surfactante pulmonar (Hou y col., 2021). Finalmente, un tercer ejemplo de esta heterogeneidad celular lo constituyen las células de Kupffer que se encuentran interconectadas a las células endoteliales sinusoidales en el hígado. Entre sus funciones se incluyen la eliminación de

desechos celulares y metabólicos, el mantenimiento de la homeostasis del hierro mediante la fagocitosis de glóbulos rojos dañados o senescentes previniendo la deficiencia o toxicidad del mismo; además, estos macrófagos contribuyen a la eliminación de plaquetas y desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica hepática, favoreciendo la interacción con las células T reguladoras (Wen y col., 2020).

Los estudios sugieren que, en general, los macrófagos residentes en los tejidos cumplen principalmente funciones homeostáticas; mientras que, aquellos derivados de monocitos infiltrados se ven principalmente involucrados en la fagocitosis de desechos celulares y patógenos circulantes en sangre, así como en la respuesta a tejido dañado. Estos macrófagos derivados de monocitos poseen una gama de receptores que les permiten detectar una amplia variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés) que, una vez unidos, provocan la activación del macrófago y la consecuente producción de citocinas como IL-1 β (interleucina 1 β), IL-8 (interleucina 8) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), así como especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), como el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) (Chaintreuil y col., 2023).

2.1.1 Receptores de membrana en macrófagos

La activación de una respuesta proinflamatoria está orquestada por patrones de expresión génica y liberación de citocinas proinflamatorias, lo cual promueve la heterogeneidad de los macrófagos y su capacidad de respuesta ante agentes patológicos que poseen estructuras conservadas como los PAMP, tales como los virus, las bacterias, los hongos y los parásitos; así como también la eliminación de desechos celulares y su función como células presentadoras de antígenos para las células T CD4⁺ (Austermann y col., 2022; Santa, 2023).

Para generar las distintas respuestas, los macrófagos cuentan con una amplia gama de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en

inglés), los cuales reconocen elementos característicos como los DAMP cuyos ligandos endógenos son derivados del huésped (componentes de la matriz extracelular, proteínas de choque térmico y elementos de orgánulos dañados) o los PAMP provenientes de patógenos; dichos receptores incluyen los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) y los tipo dominio de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés), entre otros (El-Zayat y col., 2019; Almeida-da-Silva y col., 2023).

El reconocimiento de estos patrones moleculares a través de los PRR desencadena la producción y liberación de citocinas proinflamatorias mediante la activación de NF- κ B, considerado el principal factor de transcripción responsable de la inducción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y mediadores inflamatorios. Por ejemplo, la señalización TLR4 dependiente de MyD88 (gen de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88) implica el reclutamiento de la familia de cinasas asociadas al receptor de la interleucina-1 (IRAK). Esto conduce a la activación del factor 6 asociado al receptor de TNF ligasa E3 (TRAF6), lo que resulta en la activación de TAK1 [cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)]. Posteriormente, TAK1 activa la cinasa IKK que, a su vez, fosforila el inhibidor I κ B α promoviendo su degradación y la posterior activación de los factores NF- κ B y AP-1 (proteína activadora 1) responsables de la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-6 (interleucina 6) e IL-12 (interleucina 12), además de otras moléculas como el NO liberado por las enzimas iNOS, activadas por NF- κ B en un estado proinflamatorio (Liu y col., 2017; Yu y col., 2020).

La diversidad de fenotipos funcionales que pueden adquirir los macrófagos mediante el fenómeno de polarización, responde a la variedad de estímulos a los que son expuestos y, potencialmente, a las interacciones ligando-receptor. Cabe mencionar que este conjunto de receptores de membrana expresados en los macrófagos puede regular diversas funciones, además de los procesos proinflamatorios, tales como los mecanismos de supervivencia celular, los mecanismos de adhesión y migración trans-endotelial, la fagocitosis y la actividad microbicida mediante la producción de ERO y ERN. En conjunto, estos

mecanismos permiten un reconocimiento eficiente de una amplia gama de ligandos tanto endógenos como exógenos, lo cual es fundamental para las funciones de los macrófagos en la homeostasis y durante la respuesta inmunológica innata y adaptativa del huésped (Licá y col., 2023).

2.2 Inflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmunitario a estímulos nocivos como patógenos, células dañadas o compuestos tóxicos, cuyo objetivo es proteger al organismo de estos y, posteriormente, contribuir a la recuperación de la homeostasis corporal. Las respuestas inflamatorias agudas están bien reguladas y las interacciones celulares y moleculares que se dan minimizan eficientemente la lesión restaurando la homeostasis tisular; sin embargo, un proceso inflamatorio no controlado, puede volverse crónico, lo cual puede promover el desarrollo de diversos desordenes metabólicos y enfermedades crónico degenerativas como la obesidad, la DT2, la hipertensión arterial, la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) y las cardiopatías, entre otras (Hirano, 2021).

La inflamación crónica de bajo grado se caracteriza por ser persistente en el tiempo y, en última instancia, generar daños colaterales en los órganos; por ejemplo, al inducir estrés oxidativo en las células se desencadena la producción constante de citocinas proinflamatorias vía NF- κ B generando un ciclo de retroalimentación sostenido (Furman y col., 2019).

El característico aumento en la producción de ERO por la sobre activación de los procesos proinflamatorios en macrófagos, principalmente a través de la actividad mitocondrial (estallido respiratorio), conduce a un aumento de otras moléculas indicadoras de inflamación, como el NO y el malondialdehído (MDA).

El NO es un radical libre que participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos en mamíferos. Esta molécula de señalización participa en procesos como la vasodilatación, la neurotransmisión y la respuesta inmune, entre otros; y

es producido por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOSs, por sus siglas en inglés). De las 3 isoformas reportadas (nNOS, eNOS e iNOS) hasta la fecha, la enzima iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) es considerada un mediador clave en la activación inmunitaria y la inflamación, ya que se encuentra bajo la influencia del factor NF- κ B. Mientras que, la enzima NOS neuronal (nNOS) y la enzima NOS endotelial (eNOS) se expresan constitutivamente en la célula y liberan NO en el rango de nanomolar durante periodos cortos de tiempo (segundos a minutos), la iNOS no está constantemente presente en la célula, sino que es inducible, de ahí su nombre, y únicamente se expresa cuando la célula es estimulada, generalmente por citocinas proinflamatorias y/o lipopolisacárido bacteriano (LPS).

Una vez inducida, la enzima iNOS es capaz de sintetizar cantidades significativas de NO en el rango de micromolar hasta que la enzima se degrada, lo que puede tardar horas. Esta importante cantidad de NO producida contribuye a la defensa contra patógenos invasores; sin embargo, concentraciones anormalmente altas por desregulación o sobreexpresión de la enzima iNOS pueden resultar contraproducentes y dañinos para el huésped y están asociadas a padecimientos como choque séptico, la diabetes y la disfunción cardíaca, entre otras patologías (Cinelli y col., 2020).

Por otro lado, el MDA es un compuesto dicarbonílico con la fórmula química $C_3H_4O_2$, considerado ampliamente como uno de los marcadores más conocido de la peroxidación lipídica por su fácil detección (por espectrofotometría o HPLC) mediante el ensayo TBARS. Durante las alteraciones inducidas por el estrés oxidativo, los lípidos son una de las biomoléculas más afectadas, particularmente los ácidos grasos poliinsaturados; los radicales libres atacan estas estructuras extrayendo un hidrógeno y formando radicales lipídicos inestables. Posteriormente, la inserción de una molécula de oxígeno genera radicales peroxilo lipídicos (ROO \cdot) que extraen otro hidrogeno de otra molécula lipídica, de esta manera continua la reacción y se forman compuestos más estables denominados hidroperóxidos lipídicos (ROOH). En esta serie de reacciones de peroxidación lipídica, tanto los radicales peroxilo lipídicos como los hidroperóxidos

lipídicos, pueden transformarse en productos secundarios como el MDA, que es el compuesto principal y más ampliamente estudiado (Cordiano y col., 2023).

Una vez generado, el MDA es capaz de interactuar con biomoléculas como las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otras, y las modificaciones causadas por esta interacción con el MDA puede derivar en la pérdida de su función, la pérdida de su integridad estructural y finalmente conducir a respuestas celulares alteradas (Cordiano y col., 2023).

Entre los biomarcadores de inflamación más comúnmente cuantificados se encuentran diversas citocinas, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) (Roe, 2020). La IL-6, por ejemplo, es una proteína que exhibe un comportamiento hormético, en el cual las acciones beneficiosas o nocivas que pueda ejercer en el organismo están reguladas por la intensidad, la persistencia y la naturaleza del estímulo recibido; mientras que, una liberación baja y controlada se asocia con efectos antiinflamatorios y homeostáticos. En este sentido, una producción desregulada de la IL-6 se considera un mediador proinflamatorio y prooxidante que contribuye a la generación y mantenimiento de la inflamación crónica (Forcina y col., 2022).

Guo y col. (2023) reportaron un aumento de la expresión de RNAm de TLR4 y del factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1 α) en macrófagos RAW 264.7 posterior a la inducción con LPS + IFN- γ ; además, los autores reportan que el RSV revirtió este fenómeno. Así mismo, se verificaron los niveles de proteína que resultaron ser consistentes con una menor expresión de TLR4 y HIF-1 α (factor inducible por hipoxia 1 alfa) en presencia de RSV, demostrando de esta manera la relación entre los niveles de RNAm y la expresión de proteína que pueden existir coincidentemente en determinados escenarios.

2.3 Polarización de macrófagos

Los macrófagos son elementos celulares importantes del sistema inmunitario innato, los cuales, dependiendo de los estímulos prevalentes en su

microambiente, se pueden clasificar como macrófagos activados clásicamente o proinflamatorios (M1) y activados alternativamente o antiinflamatorios (M2); a dicho fenómeno se le conoce como “polarización de macrófagos” (Kolliniati y col., 2022).

2.3.1 Macrófagos proinflamatorios (M1)

Los macrófagos M1 son generalmente activados a través de los receptores TLR, de los cuales se ha reportado que TLR2 y TLR4 son los PRR más eficientes al momento de reconocer y posteriormente activarse mediante una amplia variedad de ligandos como: lipopolisacárido de bacterias Gram – (LPS), lipopéptidos diacilo, lipopéptidos triacilo, ácido lipoteicoico (LTA), peptidoglicano de bacterias Gram + (PNG), lipoarabinomano de micobacterias y zimosano de levadura (Sameer y Nissar, 2021). Aunque la estimulación por moléculas microbianas es la vía principal para la activación de macrófagos M1, un microambiente proinflamatorio también puede contribuir de manera importante a la estimulación de estos macrófagos (Mussbacher y col., 2023).

Un evento de señalización común en la polarización de macrófagos M1 es la activación de NF- κ B, considerado un factor central en la respuesta celular a estrés. Este factor puede ser activado por una amplia diversidad de estímulos tales como: bacterias, virus, estrés físico, calor, radiación UV, estrés metabólico o incluso por acumulaciones de colesterol o ácido úrico en niveles nocivos (Mussbacher y col., 2023). La activación de NF- κ B conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, así como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) y genes antiapoptóticos que aumentan el número y la vida media de los monocitos y los macrófagos. Una vez activados, los macrófagos ejercen diversas funciones efectoras, siendo uno de sus principales mecanismos efectores la fagocitosis de patógenos y restos celulares, así como células apoptóticas (Lendeckel y col., 2022).

Otra de las funciones efectoras de los macrófagos incluye el reclutamiento y la activación de células inmunitarias mediante la liberación de interleucinas como la

IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23 e IL-8 (Lendeckel y col., 2022). Esta variedad de elementos liberados por los macrófagos M1 poseen propiedades inmunitarias beneficiosas para el huésped (Cuadro 1); sin embargo, es importante su regulación ya que una respuesta proinflamatoria excesiva o sostenida podría derivar en inflamación crónica y alterar las vías responsables de la homeostasis del tejido (Liu y col., 2021; Bajgar y Krejčová, 2023).

2.3.2 Macrófagos antiinflamatorios (M2)

Los macrófagos exhiben un grado de plasticidad, el cual depende de las señales predominantes en el microambiente celular. Mientras que, en el extremo de los macrófagos M1 encontramos una gran capacidad fagocítica y proinflamatoria, en el extremo contrario los macrófagos M2 están involucrados en la resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos (Figura 1). A diferencia de los M1, los macrófagos M2 expresan constitutivamente la enzima arginasa-1 (ARG1), la cual hidroliza la L-arginina para producir L-ornitina, un precursor de la producción de prolina e hidroxiprolina esenciales para la obtención de colágeno, que es una proteína crucial en la reparación del tejido (Ruytinx y col., 2018).

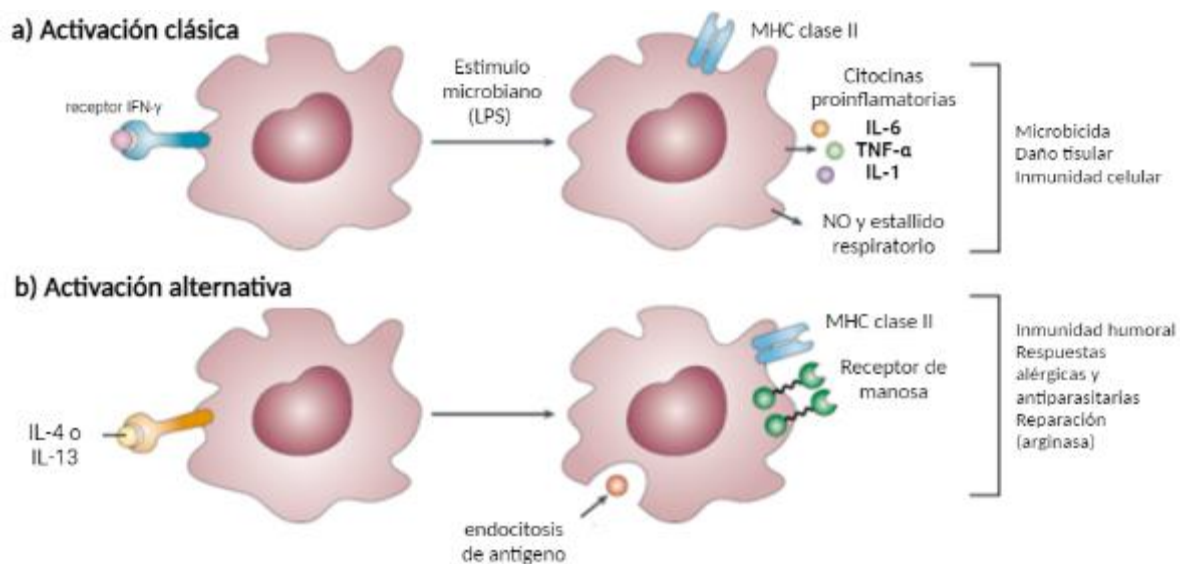


Figura 1. Activación y funciones de macrófagos M1 y M2 (Adaptada de Gordon, 2003).

En comparación con los macrófagos M1, los macrófagos M2 son funcionalmente más diversos; entre sus principales objetivos encontramos resolver la inflamación, promover la angiogénesis, facilitar la remodelación de la matriz extracelular y eliminar células senescentes y dañadas mediante eferocitosis que, contrario a la fagocitosis de objetos extraños, regula positivamente las citocinas antiinflamatorias (Wang y col., 2021).

Los macrófagos M2, tanto humanos como murinos, se han subdividido en las siguientes categorías: M2a, M2b, M2c y M2d, y difieren en sus marcadores de superficie celular, citocinas secretadas y funciones biológicas. Por ejemplo, los macrófagos M2a expresan altos niveles de IL-10 y ARG1, ejerciendo un papel en la actividad antiinflamatoria y en la remodelación de tejidos. Los macrófagos M2b son inducidos mediante ligandos del receptor tipo Toll e IL-1 β y secretan citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. Su principal función está relacionada con la inmunorregulación en cuanto a la amplitud de la respuesta inmunitaria de acuerdo al perfil de citocinas expresado. Por su parte, los macrófagos M2c son inducidos principalmente por la IL-10 o glucocorticoides y continúan expresando altos niveles de IL-10, se ven involucrados en la eferocitosis de células apoptóticas y la reparación de tejido. Finalmente, los macrófagos M2d son inducidos por la IL-6, así como agonistas del receptor de adenosina 2A (A2AR) y agonistas de TLR, los cuales secretan niveles altos de TGF- β , factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) e IL-10, así como niveles bajos de IL-1 β , IL-12 y TNF- α (Ross y col., 2021; Sun y col., 2022).

En este sentido, la IL-10 suele usarse como marcador de un estado antiinflamatorio en distintos estudios que evalúan la polarización de macrófagos, debido a su papel en la resolución de la inflamación para prevenir el daño tisular que puede provocar el mantenimiento de una respuesta proinflamatoria una vez que el patógeno ha sido eliminado. Mediante la señalización causada por la liberación de IL-10 se impide la traslocación nuclear de NF- κ B y, como resultado, la expresión de genes proinflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-1, entre otros, se ve interrumpida promoviendo así la polarización hacia M2 y restaurando la homeostasis tisular (Carlini y col., 2023).

Cuadro 1. Citocinas proinflamatorias liberadas por macrófagos M1 y sus funciones.

Interleucina	Función
IL-1 β	Inicialmente descubierta como el principal pirógeno endógeno, induce la síntesis de prostaglandinas, la activación de neutrófilos, la activación de las células T, la producción de citocinas, la activación de las células B, entre otros. Esta citocina promueve la diferenciación las células T colaboradoras tipo 17 (Th17) y tiene sinergia con la IL-12 para inducir la síntesis de IFN- γ a partir de las células T colaboradoras tipo 1 (Th1). Esta citocina se produce inicialmente como un precursor inactivo pro-IL-1 β , en respuesta a PAMP o DAMP, que necesita un estímulo adicional para generar la formación de grandes complejos multiproteicos denominados inflamasomas que finalmente provocan la activación de la caspasa 1 para procesar pro-IL-1 β a una forma madura.
IL-6	Potente inductor de la respuesta de fase aguda, desempeña un papel esencial en la diferenciación de las células B en células secretoras de anticuerpos; además, esta interleucina se encuentra implicada en la diferenciación de linfocitos y monocitos. Se ha propuesto que esta citocina tiene un papel importante en la regulación del metabolismo de glucosa, el metabolismo de lípidos y la resistencia a la insulina.
IL-10	La interleucina 10 se describe como una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias responsable de la homeostasis tisular mediante la limitación de la respuesta inmunitaria del huésped a patógenos. Las principales fuentes de esta citocina in vivo son: células T colaboradoras, monocitos, macrófagos y células dendríticas, pero, existe también una variedad de células efectoras inmunitarias capaces de producirla en determinados contextos como: células B, células T citotóxicas, las células NK, entre otras. Esta interleucina reduce directamente la producción de citocinas proinflamatorias clave como TNF- α , IL-1 β e IL-6 por parte de los macrófagos y otras células inmunes. La IL-10

	contribuye evitar la inflamación excesiva y el consecuente daño celular.
IL-12	Esta citocina contribuye a la diferenciación de células T colaboradoras tipo 1, la síntesis y la liberación de TNF- α e IFN- γ .
IL-23	La IL-23 puede constituir, junto con la IL-17, una respuesta aguda a la infección en tejidos periféricos y promover la producción de citocinas proinflamatorias.
TNF- α	Es un potente pirógeno que causa fiebre por acción directa o por estimulación de la secreción de IL-1, puede inducir apoptosis de determinadas líneas celulares tumorales y la activación de neutrófilos. Esta citocina activa y aumenta la permeabilidad de las membranas y la producción de moléculas de adhesión.

(Adaptado de Liu y col., 2021)

Es importante considerar que el estado de polarización que pueden presentar estas células es transitorio, ya que son capaces de adoptar fenotipos intermedios con subpoblaciones heterogéneas que asumen una variedad de roles fisiológicos (Wang y col., 2019), de ahí el término plasticidad. Recientemente se han estudiado subpoblaciones de macrófagos M2, los cuales se obtienen mediante la suplementación con compuestos bioactivos (Cuadro 2), mismos que pueden presentar características funcionales diversas en conjunto con la estimulación de interleucinas.

En el Cuadro 2 se ejemplifican algunos estudios sobre el efecto de la suplementación con distintos compuestos fenólicos sobre el fenómeno de polarización en distintas líneas celulares de macrófagos. Cabe destacar que, de acuerdo a este cuadro, las condiciones de cultivo en estos estudios se realizaron empleando medio DMEM con una concentración de glucosa estándar (5 mM). Posteriormente, los macrófagos se estimularon con LPS (a diferentes concentraciones) para polarizarlos hacia un fenotipo M1 y observar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la inducción de marcadores asociados a la polarización de los macrófagos.

Como se indica en el Cuadro 2, en nuestro grupo de trabajo se evaluó previamente el efecto de los compuestos RSV y D3T en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (10, 60 o 100 ng/mL) cultivados en medio hiperglucémico (25 mM de glucosa). Los resultados mostraron que el RSV, incluso bajo estas condiciones, disminuyó la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 en comparación con el D3T. Este último, por su parte, aumentó la expresión relativa de Arg1 e IL-10. Si bien Manríquez-Núñez y col. (2023) reportan el efecto tanto del RSV como del D3T en cultivo de RAW 264.7 estimulados con LPS (10, 60 o 100 ng/mL) en medio hiperglucémico (25 mM de glucosa), estos estudios no incluyen la suplementación con insulina.

Por el contrario, en el presente estudio se propone evaluar el efecto del RSV en un cultivo de macrófagos RAW 264.7 incubados a concentraciones elevadas de glucosa (25 y 30 mM) e insulina con una dosis de 10 µg/mL, la cual representa un estado de hiperinsulinemia. Cabe mencionar que para este estudio no se hace uso de la estimulación con LPS, ya que lo que se busca no es evaluar una repolarización del fenotipo M1, sino más bien evaluar el estado general de polarización cuando los macrófagos permanecen en un ambiente hiperglucémico que promueve un estado proinflamatorio y, si dadas estas condiciones, una suplementación con RSV aún tendría efecto sobre dicha polarización. Finalmente, destacamos que con las condiciones previamente mencionada se busca identificar los cambios en el perfil de polarización de los macrófagos en condiciones de individuos metabólicamente alterados, como se presentan en la obesidad y la EHGNA.

Cuadro 2. Evaluación de la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 mediante la suplementación con compuestos fenólicos.

Línea celular	Condiciones de cultivo	[Compuestos]	Resultados obtenidos	Referencias
J774A.1	37 °C en una atmósfera de CO ₂ al 5 % en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).	30 µM RSV, kaempferol y proantocianidinas, por 24 h.	Los diferentes compuestos mejoraron la expresión de Arg-1 y el receptor de manosa C-tipo 1, (MRC-1) de manera dosis dependiente.	(Ryyti y col., 2022).
J774A.1	37 °C en una atmósfera de CO ₂ al 5 % en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Estimulados con 10 ng/mL de LPS.	30 µM RSV, kaempferol y proantocianidinas, por 24 h.	El RSV y el kaempferol disminuyeron la producción de NO, MCP-1 e IL-6 de manera dosis dependiente.	
U937	37 °C en una atmósfera de CO ₂ al 5 % en medio RPMI 1640. 72 h de incubación con acetato de miristato de forbol Posterior a la maduración, los macrófagos se estimularon con 10 ng/mL de LPS.	30 µM RSV, kaempferol y proantocianidinas, por 24 h.	El RSV y el kaempferol atenuaron la producción de TNF- α e IL-6.	
RAW264.7	37 °C en una atmósfera de CO ₂ al 5 % en medio DMEM.	2 µM luteolina por 24 h.	Inhibición significativa de la expresión de TNF- α e IL-6.	(Zhang y col., 2018).

	Las células se suplementaron adicionalmente con 100 ng/mL de LPS.		El aumento en la producción de ERO por la estimulación con LPS fue suprimido por el tratamiento con la luteolina.	
RAW264.7	37 °C en una atmósfera de CO ₂ al 5 % en medio DMEM. Las células se estimularon con 1 µg/mL de LPS.	5, 10 y 20 µM 1,3,6,7-tetrahidroxi-8-prenilxantona (TPX) por 18 h.	TPX suprimió significativamente el aumento de ARNm de iNOS inducido por el LPS de manera dosis dependiente; también suprimió significativamente los niveles de IL-6 y TNF-α.	(Li y col., 2018).
RAW264.7	37 °C en una atmósfera de CO ₂ al 5 % en medio DMEM con 25 mM de glucosa. Con o sin estimulación de LPS (10, 60 o 100 ng/mL) por 24 h.	RSV o ditio-3-tiona (D3T) (2.5, 5, 10 y 20 µM)	RSV y D3T redujeron la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS y glucosa alta. D3T aumentó los niveles de GSH y normalizó los valores de MDA en glucosa alta y LPS. Respecto a los niveles de expresión de interleucinas, el RSV disminuyó los niveles de IL-6, mientras que solo D3T logró aumentar la expresión relativa de IL-10.	(Manríquez-Núñez y col., 2023)

2.4 Metabolismo de glucosa en la polarización de macrófagos

La polarización de los macrófagos es un proceso dinámico que implica una serie de procesos bioquímicos que requieren energía. En este sentido, diversos estudios *in vitro* han mostrado que los macrófagos estimulados con interferón gamma (IFN- γ) y/o LPS hacia un fenotipo M1 presentan un aumento de la tasa glucolítica y del flujo de la vía de las pentosas fosfato (PPP) para una rápida obtención de energía (Kolliniati y col., 2022).

Aunque la glucólisis es una ruta menos eficiente que la fosforilación oxidativa en términos de producción de ATP, es una vía catabólica acelerada que alimenta inmediatamente la PPP y, ya que los macrófagos requieren grandes cantidades de energía en poco tiempo para responder oportunamente ante un estímulo nocivo, la glucólisis es su vía predilecta. Por otro lado, macrófagos con un fenotipo M2 inducidos mediante IL-4 dependen de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, por sus siglas en inglés) y la oxidación de ácidos grasos (FAO, por sus siglas en inglés). Aunque se ha observado que los macrófagos activados vía TLR4 prefieren la vía glucolítica, acompañada de una disminución en la OXPHOS, para los macrófagos que son activados mediante el receptor TLR2 se aumenta tanto la glucólisis como la OXPHOS, lo cual facilita la respuesta frente a un estímulo nocivo específico (Kolliniati y col., 2022).

Recientemente se ha propuesto que el estado proinflamatorio de los macrófagos está principalmente regulado por el metabolismo celular. Estas células reprograman su metabolismo para cumplir con los requerimientos energéticos y esta reprogramación podría condicionar el fenotipo y las respuestas generadas. Como cualquier otra célula, los macrófagos presentan requisitos metabólicos particulares que dependen de las mismas vías energéticas bien caracterizadas que otras células no inmunitarias emplean (Kolliniati y col., 2022).

Aún en un estado de resistencia a la insulina, característica asociada a las patologías comúnmente vinculadas al estado de inflamación crónica como la obesidad y la DT2, la polarización proinflamatoria de macrófagos está asociada a un aumento en la afluencia de glucosa facilitada por la regulación positiva del

transportador de glucosa 1 (Glut1), independiente de insulina, que conduce a una secreción elevada de mediadores proinflamatorios y un aumento en la producción de ERO. En condiciones fisiológicas, el NADPH, obtenido mediante la PPP y como cofactor de las NADPH oxidasas (NOX), favorece la producción de ERO para el estallido respiratorio como mecanismo de defensa contra patógenos y, además, este mismo NADPH funciona como poder reductor en conjunto con el glutatión (GSH) para reestablecer el equilibrio redox celular. Por el contrario, en condiciones proinflamatorias, que ya han generado una desregulación de los sistemas endógenos antioxidantes, esta captación elevada de glucosa en macrófagos que sobreexpresan Glut1 mejora también el flujo de glucosa a través de la PPP, generando un exceso de NADPH. Este NADPH también participa en la producción de NO, ya que actúa como cofactor de la enzima iNOS contribuyendo al desbalance redox de la célula (Wong y col., 2024).

Estudios previos han demostrado que niveles elevados de glucosa (20 mM) sin insulina generan un fenotipo más glucolítico (Edgar y col., 2021). Así mismo, estudios en macrófagos peritoneales de ratón en alta glucosa (25 mM) mostraron una estimulación en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18 (Rendra y col., 2019). Por lo anterior, el estudio de cómo estas condiciones de hiperglucemia en presencia de insulina afectan a las funciones efectoras de macrófagos y su implicación en el desarrollo la inflamación es de crucial importancia.

2.4.1 Señalización de insulina en la activación de macrófagos

Las células pancreáticas son las responsables de la producción de insulina, una hormona clave para el metabolismo de la glucosa y que tiene un papel importante en el metabolismo del músculo esquelético, el tejido adiposo blanco y el hígado. Esta hormona es capaz de unirse ya sea al receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés) o a su homólogo el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF1R), lo que resulta en la fosforilación del receptor de insulina en sus residuos de tirosina y la posterior activación de las vías PI3K/AKT (vía de señalización de

la fosfatidilinositol- 3-cinasa) y MAPK (vía de la proteína cinasa activada por mitógeno) (Ieronymaki y col., 2019).

Los macrófagos son células sensibles a la insulina, lo que les permite internalizar y metabolizar la glucosa a través de transportadores específicos en la membrana como Glut1, que es independiente de insulina, y Glut4, que responde a la activación de IR y al IGF1R (Kolliniati y col., 2022). Estudios previos han demostrado que un metabolismo desregulado de la glucosa promovido por altas concentraciones de la misma, su sobreutilización y su consecuente producción desequilibrada de ERO, promueve la polarización sostenida de macrófagos M1 (Ieronymaki y col., 2019).

Es importante resaltar que los escasos estudios realizados sobre el efecto de la insulina en macrófagos parecieran ser contradictorios, ya que algunos grupos reportan una mayor producción de citocinas proinflamatorias y, en general, un fenotipo más similar al M1; mientras que, otros estudios reportaron no observar un aumento en la producción de estas citocinas e incluso proponen un potencial antiinflamatorio relacionado con un mecanismo dependiente de PI3K. Por lo anterior, el posible impacto de la insulina sobre la síntesis y la liberación de diversas citocinas por parte de los macrófagos parece depender de su origen celular y de la concentración de glucosa en el medio. En este sentido, estudios con macrófagos THP-1 cultivados en condiciones normoglucémicas (5.5 mM de glucosa) se observó que la insulina (10 μ M) incrementó la expresión de la enzima iNOS; mientras que, la suplementación de una concentración de 25 mM de glucosa inhibió significativamente la sobreexpresión de iNOS mediante la inducción de la vía de la proteína cinasa B o Akt (Püschel y col., 2022).

En general, para cada escenario proinflamatorio con los respectivos estímulos en el medio celular (concentración de carbohidratos, microambiente inflamatorio, compuestos bioactivos y concentración de insulina), los macrófagos pueden presentar una variedad de fenotipos M1 con su respectivo perfil metabólico, confirmando la plasticidad de estas células.

2.5 Macrófagos en el desarrollo de la inflamación

2.5.1 Obesidad

Se ha reportado que las personas obesas suelen presentar una mayor producción de leptina que los sujetos delgados y, al mantenerse este estado de sobreproducción, se promueven alteraciones en la señalización que derivan en la resistencia a la leptina. Además, dado que la leptina actúa como adipocina proinflamatoria, esta regula positivamente la producción de citocinas como IL-6, IL-12 y TNF- α , factores asociados a la resistencia a la insulina mediante su interacción con la vía cinasa c-Jun-NH(2)-terminal (JNK) y el complejo de la cinasa I κ B (IKK) que fosforilan al sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) en residuo de serina debilitando así la señalización de la insulina, condición asociada con el desarrollo de la DT2. A su vez, esta señalización proinflamatoria aumenta la expresión de leptina generando un circuito de retroalimentación que promueve la inflamación de bajo grado (Pérez-Pérez y col., 2020; Obradovic y col., 2021).

En el tejido adiposo, así como en el resto de nuestros órganos, están presentes diferentes tipos de células inmunitarias, cuya función principal es mantener la homeostasis del tejido (Figura 2); por lo que, además de los adipocitos, destacan los macrófagos residentes como la población más abundante, siendo entre el 5-10 % del total de células en tejido adiposo magro y aumentando hasta un 50 % en condiciones de obesidad extrema (Yao y col., 2022).

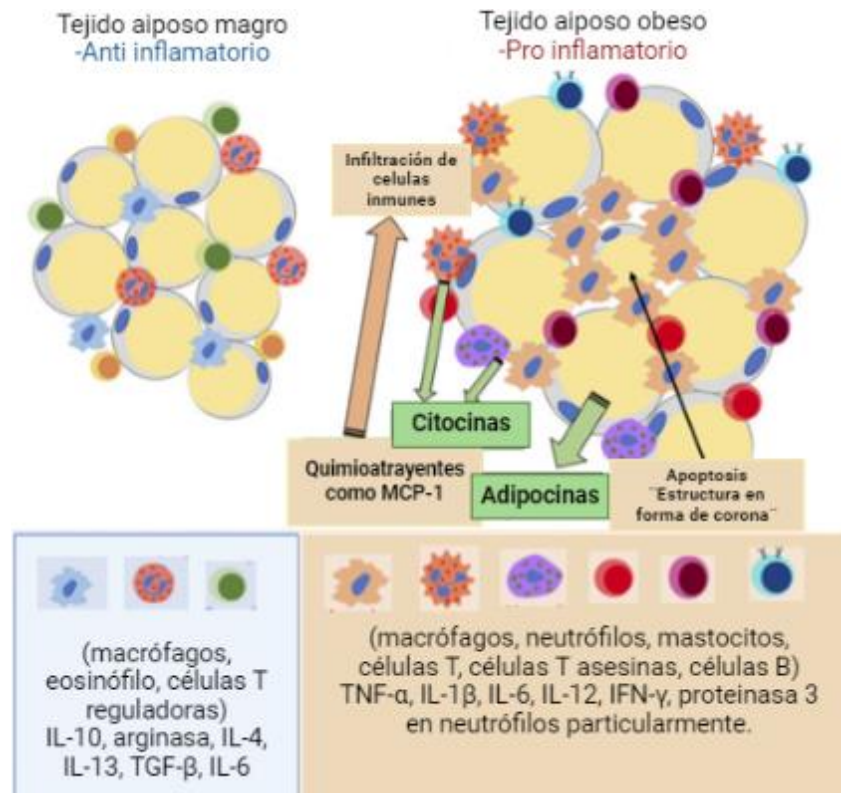


Figura 2. Estado antiinflamatorio y proinflamatorio del tejido adiposo causado por la prevalencia de macrófagos M2 (antiinflamatorios) o M1(proinflamatorios).
(Adaptado de Kawai y col., 2021)

La obesidad refleja un cambio fenotípico del tejido adiposo potenciado por la ingesta de alimentos hipercalóricos, los cuales generan una mayor acumulación de triglicéridos promoviendo la inflamación y la disfunción metabólica en los adipocitos. La hipertrofia de los adipocitos, combinada con un suministro deficiente de oxígeno, conduce a un aumento en la tasa de muerte de los adipocitos. Como consecuencia se produce un reclutamiento de macrófagos destinados a formar una estructura llamada “estructura en forma de corona (CLS)”. Esta estructura tiene como objetivo almacenar y amortiguar el exceso de lípidos liberados por los adipocitos afectados. En este escenario, los macrófagos activados hacia el fenotipo M1 liberan quimiocinas proinflamatorias, como MCP-1, para reclutar monocitos del torrente sanguíneo que, una vez infiltrados en el tejido adiposo, se activarán también hacia el fenotipo M1 debido al microambiente proinflamatorio y actuarán de forma paracrina en conjunto con los adipocitos

generando un bucle de señalización que mantiene el estado inflamatorio (Figura 2) (Yao y col., 2022).

La obesidad es una alteración metabólica asociada a la progresión de comorbilidades como la DT2, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y la EHGNA, entre otras. Estas patologías comparten distintas anomalías metabólicas como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la resistencia a insulina y la inflamación crónica de bajo grado (liberación de citocinas como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6). En la actualidad, la prevalencia de estas enfermedades ha tenido un crecimiento exponencial que ha llevado a los investigadores al estudio de las células y los mecanismos implicados en su desarrollo y mantenimiento, además, de las posibles estrategias terapéuticas para su abordaje. Entre estas estrategias se encuentra el empleo de polifenoles como el RSV, debido a su capacidad antioxidante, la cual podría contribuir a atenuar la inflamación.

2.6 Resveratrol

El RSV es un importante polifenol natural al cual se le atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antineurodegenerativas, entre otras. Este polifenol se encuentra en más de 70 especies de plantas como las uvas rojas (en la piel y semillas), el maní, la soya, las moras y los arándanos, entre otras (Meng y col., 2021).

Su capacidad para neutralizar las ERO y activar diferentes elementos antiinflamatorios es lo que confiere al RSV sus potenciales efectos benéficos a la salud. Las ERO son un grupo de moléculas altamente reactivas e inestables derivadas del oxígeno molecular que se producen como una característica inherente al metabolismo aeróbico. En este grupo se incluyen radicales como el anión superóxido, el hidroxilo, el hidroperóxido y el oxígeno singlete, así como otras especies no radicales. En condiciones fisiológicas, las ERO funcionan principalmente como moléculas de señalización que se forman durante procesos celulares como la respiración aeróbica o los procesos inflamatorios para la actividad bactericida; además, en estas condiciones existe un equilibrio entre la

generación y eliminación o neutralización de estas moléculas reactivas por los sistemas antioxidantes. Cuando diversas patologías desregulan estos sistemas y favorecen la formación excesiva de ERO y ERN, y a la par que se dañan los sistemas endógenos antioxidantes, se conduce a un daño molecular denominado estrés oxidativo (Jakubczyk y col., 2020), potenciando de esta manera el estado inflamatorio.

Entre las vías antiinflamatorias sobre las que influye el RSV se encuentra la vía sirtuina 1 (Sirt1), la cual interrumpe la señal TLR4/NF- κ B/STAT (transductor de señal y activador de transcripción, STAT por sus siglas en inglés), lo que a su vez reduce la transcripción de elementos proinflamatorios derivados de macrófagos como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y metaloproteasas (MMP-1 y MMP-3). El RSV se une directamente a Sirt1 inhibiendo la acetilación de la subunidad proteica p65/RelA, uno de los principales componentes del complejo NF- κ B, disminuyendo así la transcripción de citocinas proinflamatorias (Malaguarnera, 2019). Además, se ha reportado en estudios *in vitro* que el RSV puede inhibir la actividad de la enzima fosfodiesterasa, la cual degrada el AMPc aumentando sus niveles, lo que activa a la proteína cinasa A (PKA) que, a su vez, fosforila y activa Sirt1 para salir del núcleo y unirse al RSV (Malaguarnera, 2019; Wang y col., 2021).

Otra de las características importantes del RSV es su capacidad para neutralizar el estrés oxidativo celular mediante la estimulación de los sistemas antioxidantes endógenos (Meng y col., 2020; Alvarenga y col., 2023). En este sentido, se ha reportado que el RSV es un activador del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), un factor de transcripción maestro que regula la transcripción positiva de numerosos genes de enzimas antioxidantes, proteínas citoprotectoras así como del metabolismo de lípidos mediante su unión a una secuencia específica y conservada del ADN denominada ARE (elementos de respuesta antioxidante, por sus siglas en inglés) (Cuadrado y col., 2018). Nrf2, forma un complejo con la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1, por sus siglas en inglés) que funciona como inhibidor previniendo la translocación de Nrf2 al núcleo. Se ha reportado que el RSV aumenta la expresión de la proteína de autofagia p62 que se une a Keap1, facilitando con ello la liberación y translocación de Nrf2 al núcleo. En este sentido,

el RSV disocia las uniones entre Nrf2-Keap1 a través del aumento de la interacción entre p62-Keap1 (Tahereh y col., 2020). Se ha reportado también que Nrf2 es capaz de bloquear la degradación de I κ B- α , inhibiendo la translocación nuclear de NF- κ B y, por lo tanto, la síntesis de citocinas proinflamatorias. Aunado a lo anterior, Nrf2 induce la transcripción de enzimas antioxidantes como la quinona oxidoreductasa (NQO1) y la súper óxido dismutasa (SOD), así como las enzimas de síntesis del glutatión reducido (GSH), entre otras, contribuyendo, en gran medida, a las especies capaces de neutralizar las ERO (Saha y col., 2020). Además, se ha reportado que Nrf2 posee sitios de unión cercanos a las regiones promotoras en los genes que codifican para interleucinas proinflamatorias como la IL-1 β e IL-6, limitando de esta manera su transcripción por la ARN polimerasa II. Cabe destacar que esta característica de bloqueo transcripcional por Nrf2 parece depender del tejido y tipo de célula bajo tratamiento, ya que se ha reportado en hepatocitos que, cuando Nrf2 se une a su elemento de respuesta antioxidante (ARE), al mismo tiempo puede incidir sobre la región promotora del gen IL-6 aumentando su transcripción (Goodfellow y col., 2020; Saha y col., 2020).

En resumen, gran parte de la investigación realizada hasta el momento en esta área se ha centrado en evaluar los efectos de diversos compuestos bioactivos, siendo el RSV el compuesto más reportado. Dichos estudios han demostrado que el RSV puede atenuar el estado proinflamatorio de los macrófagos M1 previamente estimulados con LPS, favoreciendo su polarización hacia un fenotipo M2. Sin embargo, es fundamental considerar la influencia de las señales del microambiente sobre el fenómeno de polarización de los macrófagos, ya que esta puede verse modulada por factores como la concentración de azúcares y la intensidad del estímulo proinflamatorio. Este último aspecto no solo se refiere al tipo de señal activadora (LPS, glucosa o insulina alta, entre otras), sino también al tiempo de permanencia de dicha molécula en el microambiente celular, ya que implica la continua estimulación de los mecanismos proinflamatorios. Lo anterior plantea una brecha interesante para la investigación que ayude a comprender de mejor manera como la prevalencia e intensidad de determinados estímulos puede afectar los estados de polarización y la actividad del compuesto bioactivo en estudio.

III. JUSTIFICACIÓN

Los macrófagos son considerados los principales orquestadores de los mecanismos proinflamatorios en los diversos tejidos. Si bien existe amplia evidencia que respalda los efectos benéficos de compuestos bioactivos como el RSV en la atenuación del estado proinflamatorio de los macrófagos, la eficacia de estos efectos bajo un estado hiperglucémico sostenido en el cultivo (7 días), en combinación con una estimulación con altas concentraciones de insulina, se encuentra escasamente explorada. En este sentido, y derivado de los proyectos de investigación previamente realizados en nuestro laboratorio en los cuales se emplearon medios condicionados por macrófagos cultivados en condiciones de glucosa elevada, con el fin de simular un modelo *in vitro* de esteatosis hepática en células HepG2 suplementada con insulina elevada, surgió la necesidad de generar un protocolo para la evaluación del estado proinflamatorio de macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones de glucosa e insulina elevadas, características de individuos con una dieta hipercalórica), además de mantener dicho estímulo por 7 días. A diferencia de los protocolos convencionales, en los que la estimulación proinflamatoria con LPS o glucosa elevada oscila en rangos de tiempo de 6 h a 72 h, con estas nuevas variables propuestas se obtuvo una aproximación a un entorno celular más representativo de un estado metabólicamente alterado crónico. Esta propuesta experimental permitirá generar datos que ofrecen un panorama más preciso sobre el comportamiento inflamatorio de los macrófagos en condiciones de estimulación sostenida, así como sobre la capacidad moduladora del RSV en dicho contexto. Además, los datos obtenidos podrán ser útiles para el análisis de resultados en proyectos relacionados al desbalance metabólico inducido por dietas hipercalóricas, particularmente aquellos que empleen medios condicionados o co-cultivos con macrófagos como modelos de estudio.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del RSV sobre indicadores proinflamatorios, como las citocinas y el estado redox, de macrófagos RAW 264.7 bajo condiciones sostenidas de hiperglucemia y alta concentración de insulina para mimetizar el microambiente presente en los individuos con una dieta hipercalórica.

4.2 Específicos

Evaluar el efecto del RSV sobre el estado redox de macrófagos en condiciones sostenidas con alta glucosa e insulina.

Evaluar el efecto del RSV sobre marcadores proinflamatorios de macrófagos en condiciones sostenidas con alta glucosa e insulina.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular

Se emplearon macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 (American Type Culture Collection-ATCC, MD, USA), cultivados en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, Merck KGaA, DEU) a diferentes concentraciones de glucosa [glucosa estándar (5 mM) y glucosa alta (25 y 30 mM)] suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, MA, USA) y 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Sigma, Merck KGaA, DEU) en atmósfera controlada a 37 °C y 5 % CO₂ – 95 % O₂.

Para los diferentes ensayos, los macrófagos RAW 264.7 se sembraron en placas de 96 con diferentes concentraciones de glucosa (5, 25 y 30 mM) y, exceptuando el control de 5 mM de glucosa, al resto de tratamientos se les suplementó insulina (Ins) a una concentración de 10 µg/mL (Trepiana y col., 2020; Ávalos-Marquéz, 2023). El número de células que se sembraron en las placas de 96 pozos y en las placas de 60 mm, como se indican en cada sección de la metodología, tuvo la finalidad de que la confluencia deseada (80 %) se alcanzará en un periodo de incubación de 7 días y, en el séptimo día se añadió 10 µM de RSV (Sigma, Merck KGaA, DEU) reportado por Manríquez y col. (2023), durante 24 h y al finalizar se realizaron las determinaciones correspondientes.

5.2 Ensayos de viabilidad celular

5.2.1 Ensayo de bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT)

Los experimentos se realizaron en placas de 96 pozos con una concentración celular inicial de 2×10^4 células en 200 µL de medio DMEM por pozo. Mediante el ensayo de MTT (Sigma, Merck KGaA, DEU) es posible determinar si los intervalos de concentraciones utilizadas en el estudio presentan o no potenciales efectos citotóxicos para el cultivo

Este ensayo de viabilidad celular se basa en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto llamado formazán de color púrpura, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas de manera que, la cantidad de células vivas, es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Al finalizar la incubación (7 días) con los tratamientos, se retiraron de la placa y se adicionaron 100 μ L de medio de cultivo con glucosa estándar y 100 μ L de MTT previamente preparado; la placa se incubó 30 min a 37 °C para posteriormente remover el medio y añadir 200 μ L de DMSO para solubilizar los cristales de formazán obtenidos. La lectura de la absorbancia se midió a 570 nm en espectrofotómetro de placas Varioskan (Thermo ScientificTM, Waltham, MA, USA) y los resultados se expresan en porcentaje contra un control sin tratamiento en condiciones estándar de glucosa.

5.2.2 Cuantificación de proteína total por el ensayo del ácido bicinconínico (BCA)

Para la cuantificación de proteína total se empleó el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, MA, USA). Este método colorimétrico establecido por Smith (1985) se basa en la formación de un complejo proteico Cu^{2+} en un medio básico seguido de la reducción a Cu^{1+} que interactúa con 2 moléculas de BCA generando un cambio de color a púrpura con una absorbancia medible a 562 nm.

Para el ensayo BCA, los macrófagos RAW 264.7 se sembraron en una placa de 96 pozos a una concentración inicial de 2×10^4 células por pozo con los respectivos tratamientos por 7 días y, una vez alcanzada la confluencia, se añadió el RSV para posteriormente incubar durante 24 h. Al finalizar se retiraron los tratamientos y se lisaron las células por choque térmico agregando 50 μ L de PBS 1X. Posteriormente, al lisado se adicionó la solución de trabajo de BCA (50 partes de solución A por cada parte de solución B) y la placa se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se registró la absorbancia a 562 nm en espectrofotómetro de placas Varioskan y el contenido de proteína se calculó por

extrapolación a una curva estándar con albúmina sérica bovina (2 mg/mL BSA, por sus siglas en inglés; Sigma, Merck KGaA, DEU); de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.3 Cuantificación de nitritos por el reactivo de Griess

La detección de NO es una forma de monitorear los mecanismos de activación de NF- κ B descritos previamente característicos del estado proinflamatorio. Para lo anterior, se cuantificaron los niveles de nitritos/nitratos, como una medida indirecta del NO, en el medio de cultivo de los macrófagos RAW 264.7 mediante la reacción de Griess. Para lo anterior, los macrófagos RAW 264.7 se sembraron en placas de 96 pozos a una concentración inicial de 2×10^4 células por pozo con los respectivos tratamientos y una vez alcanzaron la confluencia en un periodo de incubación de 7 días y posterior a las 24 h de incubación con RSV en el séptimo día, se tomaron 50 μ L del sobrenadante y se colocaron en una placa de 96 pozos donde se añadieron 50 μ L de sulfanilamida y se incubó por 5 min a temperatura ambiente protegido de la luz; posteriormente, se adicionaron 50 μ L de *N*-1-(naftil)-etilendiamina (NED) y la placa se incubó durante 30 min protegida de la luz para finalmente realizar la lectura de la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro de placas Varioskan. Los resultados se expresaron como μ M de nitritos por extrapolación a curva de calibración con nitrito de sodio.

5.4 Determinación de GSH total

La cuantificación de grupos tioles totales se emplea para evaluar el nivel endógeno de sistemas antioxidantes y se realizó como se describe a continuación (Ulrich y Jakob, 2019). Para lo anterior, los macrófagos se sembraron en placas tipo Petri de 60 mm (1×10^5) y se incubaron con los respectivos tratamientos por 7 días hasta confluencia para posteriormente añadir RSV por 24 h el último día; al concluir la incubación con RSV las células se enjuagaron con PBS de 2 a 3 veces para después ser recolectadas en 3 mL de PBS 1X y realizar una lisis celular por choque térmico.

Una vez lisadas las células, se tomaron 150 μ L de lisado celular y se colocaron en un tubo tipo eppendorf junto con 120 μ L de H₂O destilada y 30 μ L de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) al 20 % y se homogeneizó la muestra empleando un vortex. Una vez homogeneizadas, las muestras se dejaron reposar por 30 min en hielo y se centrifugaron a 8750 rpm a 4 °C por 5 min; posteriormente, se recuperaron 50 μ L del sobrenadante y se colocaron por triplicado en placa de 96 para añadir 150 μ L de solución Tris-EDTA a pH 8.2, y 100 μ L de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) en metanol (Tietze, 1969). Finalmente, la placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente protegida de la luz y se registró la absorbancia a 412 nm en espectrofotómetro de placas Varioskan. Los resultados se presentan por extrapolación con curva de calibración de GSH (0 a 200 μ M).

5.5 Detección de MDA por el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este ensayo detecta los niveles de malondialdehído (MDA) como principal producto de la peroxidación lipídica derivado de las condiciones experimentales propuestas, el cual se considera un buen indicador de los niveles generales de estrés oxidativo celular. La técnica se realiza en presencia de calor y un medio ácido donde el MDA reacciona con 2 moléculas de TBA (ácido tiobarbitúrico) para formar un aducto coloreado MDA-TBA₂ (TBARS, por sus siglas en inglés), el cual puede ser detectado a 532 nm.

Para este ensayo, los macrófagos se sembraron en placas tipo Petri de 60 mm (1x10⁵) con los distintos tratamientos por 7 días y posterior a las 24 h de incubación con RSV el último día se retiraron, tomando una parte de muestra por 5 partes de reactivo de TBARS. Las muestras se sonicaron en agua destilada a 90 °C por 20 min para posteriormente dejar enfriar y centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, finalmente se tomaron 270 μ L del sobrenadante y se colocaron en una placa de 96 para registrar su absorbancia a 532 nm en espectrofotómetro de placas Varioskan. Los resultados se expresan como equivalentes de MDA normalizados con la concentración de proteína celular de la muestra correspondiente.

5.6 Aislamiento de RNA y análisis por qPCR

La cuantificación de la expresión relativa de RNAm, como estrategia para determinar el impacto de las condiciones experimentales propuestas sobre el estado proinflamatorio de los macrófagos, se realizó de la siguiente forma. El RNA total se aisló de los macrófagos RAW264.7 posterior al periodo de incubación con los diversos tratamientos siguiendo el protocolo del reactivo TRIzol (TRIzol™, Invitrogen, MA, USA); posteriormente, el RNAm aislado se transcribió inversamente hacia ADNc siguiendo las instrucciones del kit M-MLV RT de Promega (Promega, WI, USA). Al finalizar los procedimientos se realizó la determinación por PCR en tiempo real siguiendo el protocolo del reactivo FastStart SYBR Green Master (Roche, Basilea, CHE). El análisis de la expresión relativa de RNAm se realizó por medio del sistema de PCR StepOne RealTime (Applied Biosystems, MA, USA) con el siguiente programa: precalentamiento a 95 °C durante 10 min; desnaturalización 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 como parte del método de normalización para el análisis de la expresión relativa $\Delta\Delta C_t$ mediante la fórmula $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{muestra objetivo}) - \Delta C_t(\text{muestra de referencia}) = (C_{T_D} - C_{T_B}) - (C_{T_C} - C_{T_A})$ (Livak & Schmittgen, 2001). Las secuencias de los iniciadores empleados para el análisis se tomaron de Manríquez y col. (2023) y se detallan a continuación en el Cuadro 3. La especificidad de los mismos se verificó mediante Primer-BLAST en NCBI.

Cuadro 3. Secuencias de los iniciadores para el análisis de la expresión relativa de genes relacionados al fenómeno de polarización.

Gen	Sentido	Reversa	Referencia	Tm
IL-6	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTT	GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC	NM_001314054.1	60 °C
IL-10	GCCTTGCAGAAAAGAGAGCT	AAAGAAAGTCTTCACCTGGC	NM_010548.2	56 °C
18s	CGGAAAATAGCCTTCGCCATCAC	ATCACTCGCTCCACCTCATCCT	NM_011296.3	60 °C
RPL0	ATCGTCTTAAACCCGCGT	CTGCCGTTGTCAAACACCTG	NM_007475.5	60 °C

5.7 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada determinación realizada se aplicó ANOVA de una vía seguido de una comparación de medias mediante un análisis Dunnett ($p < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete GraphPad Software versión 8.0.1 (GraphPad Software, CA, USA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente a nivel global, el aumento en la prevalencia de enfermedades no transmisibles como el sobrepeso y la obesidad, asociadas a un estado inflamatorio crónico de bajo grado, ha generado una gran preocupación en torno a la salud pública. Estos desequilibrios metabólicos son un factor importante de riesgo para el desarrollo de padecimientos asociados como la DT2, las cardiopatías, la EHGNA, entre otras anomalías metabólicas, afectando la calidad de vida de millones de personas. En México, alrededor del 75 % de personas adultas presentan sobrepeso u obesidad; así mismo, alrededor de 35.6 % de la población infantil se ve afectada por estas condiciones y por el desarrollo de las comorbilidades asociadas a dicho estado de salud.

La inflamación, componente central de la inmunidad innata, constituye un mecanismo mediante el cual el organismo mantiene la homeostasis a través de la inmunovigilancia para la defensa del huésped. Sin embargo, cuando se presenta un estado inflamatorio crónico de bajo grado, la homeostasis sistémica se ve alterada y se favorece la aparición de diversas patologías no transmisibles. En la obesidad el tejido adiposo visceral es el principal foco de un estado inflamatorio que se mantiene en el tiempo debido a la aparición de adipocitos disfuncionales y la constante infiltración de células inmunitarias, particularmente macrófagos. En este escenario se favorece la creación y mantenimiento de un microambiente proinflamatorio con citocinas clave como TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Los macrófagos presentes en el tejido adiposo de individuos con dietas hipercalóricas tienden a polarizarse hacia macrófagos M1 exacerbando la cascada de señalización proinflamatoria, debido principalmente a la presencia de adipocitos que han sufrido hipertrofia e hiperplasia y que secretan adipocinas proinflamatorias.

Generalmente, el fenómeno de polarización de macrófagos se aborda a través de la suplementación de moléculas inductoras (LPS, TNF- α , etc.) o compuestos con potencial bioactivo (RSV, D3T, etc.). No obstante, el abordaje de este fenómeno

desde la perspectiva de los desórdenes metabólicos como los inducidos por niveles suprafisiológicos de glucosa e insulina es relativamente reciente.

6.1 Prueba de viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar y glucosa alta de insulina y suplementados con resveratrol.

Inicialmente se evaluó la viabilidad celular de los macrófagos RAW 264.7 mediante el ensayo de MTT con la finalidad de definir si las distintas condiciones de cultivo afectan la calidad de macrófagos metabólicamente activos. Las condiciones de cultivo reportadas aquí derivan de proyectos de investigación previos (Ávalos-Marquéz, 2023; Manríquez-Núñez, 2023) donde se utilizaron medios condicionados de macrófagos con glucosa elevada, LPS y cultivo de células HepG2 suplementadas con insulina para la generación de un modelo de esteatosis hepática. En este sentido, el presente proyecto evalúa particularmente este conjunto de características asociadas a un microambiente hiperglucémico para observar los posibles efectos metabólicos sobre los mecanismos proinflamatorios en macrófagos RAW 264.7.

Al incubar macrófagos en condiciones hiperglucémicas con 25 mM y 30 mM de glucosa sin suplementación con insulina, la viabilidad celular aumentó en un 14 y 18 %, respectivamente, en comparación con el cultivo en condiciones normoglicémicas. Por otro lado, al suplementar los medios hiperglucémicos (25 mM y 30 mM) con insulina se obtuvo un aumento de la viabilidad del 6.7 y 16 % respecto a los macrófagos control incubados con 5 mM de glucosa. Aunado a lo anterior, la adición de RSV (10 μ M) normalizó la viabilidad de las células RAW 264.7 a 25 mM de glucosa suplementado con insulina respecto al control; sin embargo, bajo la condición con 30 mM de glucosa con insulina se observó un aumento en la viabilidad del 13 % respecto al control (Figura 3).

Se ha reportado que las células RAW 264.7 incubadas con 25 mM y 30 mM de glucosa por 24 h no muestran una variación significativa en la viabilidad celular (Jia y col., 2015; Liao y col., 2020), lo que difiere con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, esta diferencia podría atribuirse a la variación

en los tiempos de estimulación con glucosa. Como se ha mencionado previamente, en este estudio los cultivos se incubaron en condiciones de hiperglicemia durante 7 días; mientras que, en los estudios citados los protocolos indican tiempos de incubación entre 12 y 72 h. Por otro lado, Manríquez y col. (2023) mantuvieron cultivos de macrófagos RAW 264.7 en un medio con 25 mM de glucosa por un periodo de tiempo similar al usado en este estudio y obtuvieron un aumento significativo de la viabilidad respecto al control 5 mM, coincidiendo con los resultados aquí reportados.

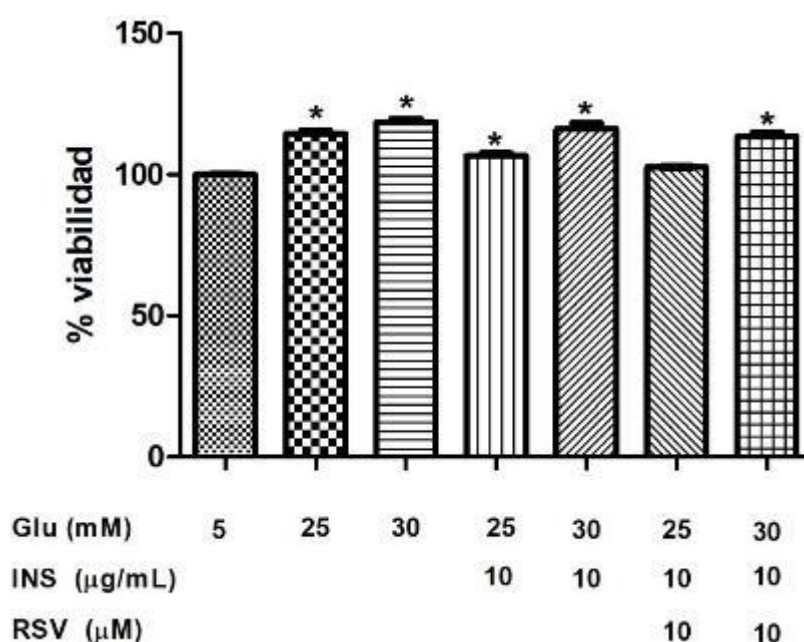


Figura 3. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre la viabilidad de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV, evaluada mediante el ensayo de MTT. * Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

Una de las funciones de los macrófagos consiste en censar cambios en su microambiente y, para ser capaces de generar respuestas inmunológicas adecuadas, poseen vías metabólicas flexibles que responden a estas alteraciones. Si bien comúnmente la reprogramación metabólica de los macrófagos se asocia con su polarización hacia los fenotipos M1/M2, se sabe que

también la disponibilidad de nutrientes en el medio puede influenciar su metabolismo. En este estudio, los macrófagos fueron activados metabólicamente mediante la exposición a niveles altos de glucosa, junto con la adición de insulina al medio de cultivo.

En los individuos, las células β pancreáticas son las encargadas de la secreción de insulina para la internalización de la glucosa y su posterior metabolismo. En los macrófagos, la presencia de insulina induce la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 del citoplasma a la membrana celular aumentando la entrada de glucosa a la célula y favoreciendo su metabolismo glucolítico y la vía de las PP (Russo y col., 2021). Los pasos oxidativos en la vía de las PP son cruciales para los macrófagos ya que generan NADPH que es utilizado por la enzima NADPH oxidasa para la producción de EROS (Viola y col., 2019). Además, se ha reportado que los macrófagos metabólicamente activados poseen una mayor actividad mitocondrial; por lo tanto, se infiere que debido al aumento de la glucólisis y de la actividad mitocondrial, hay una mayor producción de NADPH. El NADPH es el principal agente reductor del MTT lo que podría explicar el aumento en el porcentaje de viabilidad obtenido en hiperglucemia (Ghasemi y col., 2021). En ningún caso se observó una reducción de la viabilidad celular por lo que ninguna de nuestras condiciones experimentales presenta toxicidad para el cultivo.

Se ha reportado que los macrófagos metabólicamente activados poseen una mayor actividad mitocondrial; por lo tanto, se infiere que debido al aumento de la glucólisis y de la actividad mitocondrial, hay una mayor producción de NADPH. El NADPH es el principal agente reductor del MTT lo que podría explicar el aumento en el porcentaje de viabilidad obtenido en hiperglucemia (Ghasemi y col., 2021). En ningún caso se observó una reducción de la viabilidad celular por lo que ninguna de nuestras condiciones experimentales presenta toxicidad para el cultivo.

Con los resultados obtenidos en este ensayo (Figura 3) se confirma que las concentraciones de glucosa e insulina, así como de RSV utilizadas, no presentan citotoxicidad para el cultivo, lo cual coincide con lo reportado previamente por

otros grupos de investigación (Suzuki y col., 2021; Suriyaprom y col., 2023). Particularmente se verificó que la concentración de insulina utilizada en este estudio (10 µg/mL) no disminuyó la viabilidad de las células RAW 264.7. Este hallazgo es relevante, ya que actualmente no existen estudios en cultivo de macrófagos RAW 264.7 con las condiciones aquí utilizadas.

6.2 Cuantificación de proteína por BCA en cultivos de macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar y glucosa alta en presencia de insulina alta y suplementados con resveratrol.

También se realizó el ensayo de BCA para evaluar la concentración total de proteína celular, como una medida indirecta del número de células bajo las diferentes concentraciones de glucosa con insulina y RSV. Este análisis permitió descartar efectos citotóxicos asociados a los tratamientos.

Como se muestra en la Figura 4, la cuantificación de proteínas por BCA en los cultivos de macrófagos RAW 264.7 aumentó hasta un 27 % para las células con glucosa 25 mM respecto al control de glucosa estándar. Mientras que, para los cultivos con glucosa elevada (25 mM y 30 mM) e insulina y suplementados con RSV se observó una disminución en la concentración total de proteínas del 21 % y 26 %, respectivamente, en comparación con el control con 5 mM de glucosa. El resto de las condiciones evaluadas no presenta ningún cambio respecto a este control (Figura 4).

Los resultados obtenidos con 25 mM de glucosa coinciden con lo reportado por Venter y col. (2014), en cuyo estudio las células RAW 264.7 en 25 mM de glucosa (24 h) estimuladas con LPS aumentan su contenido de proteína total. En el presente estudio no se suplementó LPS en los cultivos; sin embargo, estudios previos reportan que un microambiente hiperglucémico es suficiente para activar las células y promover la secreción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos. Además, está ampliamente reportado que estímulos proinflamatorios cambian el flujo metabólico de los macrófagos hacia la glucólisis; por lo que se infiere que, en ambos casos es independiente del estímulo proinflamatorio (LPS o

hiperglucemia), los macrófagos se activarán y tendrán un incremento en su actividad metabólica; y, por lo tanto, un aumento del contenido de proteína entre el cual, se podría suponer, encontraríamos citocinas, quimiocinas y otras proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria. (Dissanayake y col., 2021; Sun y col., 2022; Sousa y col., 2023). Aunado a lo anterior, la observación bajo el microscopio del cultivo de macrófagos RAW 264.7, en glucosa 25 mM, mostró un aumento significativo de la densidad celular. Este aumento en el número de células también podría explicar el aumento del contenido de proteína.

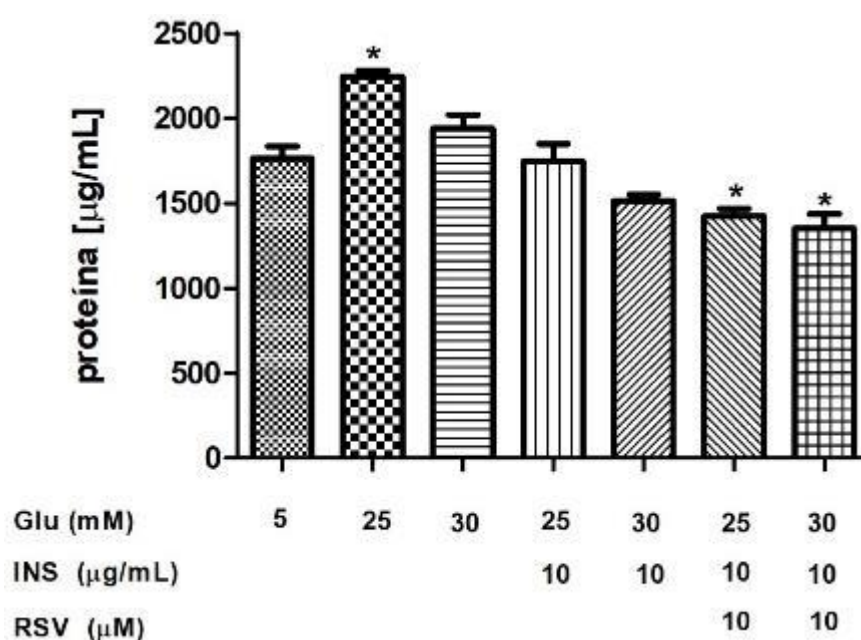


Figura 4. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre el contenido de proteína en la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV, determinada por el método de BCA. * Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

En la Figura 4 no se observa un aumento en el contenido proteico en las condiciones más elevadas de glucosa (30 mM), ni en aquellas suplementadas con insulina (25 mM y 30 mM de glucosa). Esto podría deberse a la abundante disponibilidad de glucosa en el medio que estimula la glucólisis como principal vía metabólica con la consecuente activación de los mecanismos celulares

proinflamatorios y el aumento desregulado de ERO y ERN que conducen a una disfunción mitocondrial y a la activación de las oxidasas NADPH citoplasmática (Rendra y col., 2019). También se observó un incremento en los niveles de NO y MDA que contribuyen al mantenimiento del estrés celular y la disfunción de las biomoléculas mediante su interacción.

Finalmente, en el contexto de un estrés celular creciente los mecanismos celulares se concentrarían en la reparación celular y el mantenimiento de los sistemas antioxidantes endógenos, disminuyendo la proliferación y síntesis de nucleótidos (Plauth y col., 2016).

Se ha reportado que polifenoles, como el RSV, pueden actuar también como prooxidantes dependiendo de las condiciones en el microambiente como: pH, concentración de compuesto fenólico, estado REDOX basal (equilibrio entre oxidantes y antioxidantes en la célula), entre otras, que impactan en la proliferación celular (Do Carmo y col., 2021). Se reporta que la oxidación del RSV se produce en condiciones fisiológicamente relevantes; por ejemplo, la hiperglucemia causa un desequilibrio redox en el microambiente celular volviéndolo altamente oxidativo, lo que puede causar que el RSV se autooxide y genere semiquinonas, lo cual tendría un efecto prooxidativo sobre el sistema y exacerbaría la cascada de ERO ya existente (Plauth y col., 2016; Fonseca y col., 2018).

En la Figura 4, los cultivos de macrófagos con 25 mM y 30 mM de glucosa con insulina suplementados con RSV reportan una disminución en el contenido total de proteína del 19 % y 23 %, respectivamente. Se propone que el posible efecto prooxidativo del RSV afectaría la síntesis proteica y la proliferación celular debido al aumento de ERO y, por lo mismo, se infiere que su efecto sobre los sistemas antioxidantes sería mínimo (Ghosh & Shcherbik, 2020; Shaito y col., 2020), con lo cual se podrían sustentar la disminución en el contenido proteico previamente mencionado.

Hasta el momento no hay evidencia reportada que apoye o refute los posibles beneficios del RSV en un microambiente hiperglucémico con insulina elevada o incluso únicamente con insulina elevada por más de 48 h. Por ello, y como se ha planteado en el proyecto, proponemos que una exposición más prolongada del cultivo a un ambiente proinflamatorio causaría una disminución en el posible efecto del RSV sobre la atenuación de los procesos inflamatorios.

6.3 Variación en la producción de óxido nítrico en cultivo de macrófagos RAW 264.7 en condiciones de glucosa estándar y glucosa alta en presencia de insulina alta y suplementados con resveratrol.

El NO, producido por la isoforma inducible de la enzima iNOS en respuesta a la activación del sistema inmunológico, actúa como un agente tóxico para patógenos. Este radical es la principal ERN producida por las células y es también la principal fuente de otras ERN. Durante condiciones patológicas, como un estado proinflamatorio sostenido, el NO se vuelve nocivo debido a su alta reactividad con otros radicales libres presentes en el medio como el anión superóxido (O_2^-), generando peroxinitrito (ONOO). Cuando el sistema biológico presenta un desbalance entre estas dos especies reactivas (ERN y ERO) se ven interferidos diversos mecanismos moleculares que afectan el ciclo celular (Martínez & Andriantsitohaina, 2009; Palmieri y col., 2020).

La producción desregulada de ERN favorece la aparición de estrés nitrosativo que puede ser tóxico para la célula misma, y, es por todo lo anterior que la detección de nitritos como metabolitos finales de la descomposición del NO nos ayuda a monitorear el efecto que pueden o no tener las condiciones experimentales utilizadas sobre la posible activación de los mecanismos proinflamatorios.

Se encontró que la estimulación de macrófagos únicamente con glucosa elevada (25 mM y 30 mM) aumentó la producción de nitritos en un 11 % y 24 %, respectivamente (Figura 5). En este contexto, los macrófagos están clasificados como células principalmente glucolíticas, por lo que una exposición prolongada en condiciones de alta glucosa se promueve el metabolismo de carbohidratos

mediante la glucólisis (Zhu y col., 2015). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos por Dissanayake y col. (2021), quienes reportan que una sobreestimulación de la glucólisis causada por un estímulo de glucosa elevado, aún en periodos cortos, promueve la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1. En contraste con nuestros resultados, otros estudios han reportado que en cultivos de macrófagos (BMDM) con glucosa elevada (25 mM) por 7 días y estimulados con 50 ng/mL de LPS, la producción de NO se ve reducida, pero se expresan niveles más altos de citocinas como TNF- α e IL-1 sugiriendo así el mantenimiento de un fenotipo proinflamatorio (Pavlou y col., 2018; Sousa y col., 2023).

Interesantemente para los macrófagos en medio con 25 mM de glucosa con insulina no se observaron cambios en el nivel de NO respecto al control, pero si se observó una disminución respecto a los macrófagos en medio con 25 mM de glucosa sin insulina (Figura 5). Estos resultados coinciden con lo reportado por Yu y col. (2019), donde macrófagos THP-1 en glucosa 25 mM por 72 h y suplementados con 10 μ M de insulina por 24 h mostraron una disminución en el nivel de expresión de iNOS respecto al cultivo de TPH-1 en glucosa 25 mM sin insulina y valores similares al cultivo de TPH-1 en glucosa 5.5 mM. Los investigadores atribuyen tal efecto sobre iNOS a la activación de la vía PI3K/Akt por acción de la insulina.

Por otro lado, los macrófagos en 30 mM de glucosa con insulina tuvieron un incremento de 10.4 % en la producción de NO respecto al cultivo estándar (5 mM de glucosa) (Figura 5). Esto podría deberse a la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β que, de manera autocrina, activan elementos proinflamatorios como JNK e IKK β lo que deriva en un ciclo de amplificación inflamatoria (Acosta-Martinez & Cabail, 2022). La diferencia observada en la producción de NO entre las condiciones de 25 mM de glucosa + insulina y 30 mM de glucosa + insulina sugiere que, en condiciones más desafiantes (30 mM de glucosa) la insulina pierde su efecto antiinflamatorio, como lo proponen Yu y col. (2019), lo que explicaría la ausencia de una disminución en la producción de NO en dichas condiciones.

En los cultivos de macrófagos incubados con 25 mM de glucosa con insulina, la suplementación con RSV disminuyó la concentración de NO en un 12 %, en comparación con el control con glucosa estándar 5 mM (Figura 5). Este dato es relevante, ya que una reducción en la producción de NO en presencia de insulina es deseable debido a que la presencia desregulada de esta molécula es característica de una condición hiperglucémica en individuos. En este contexto, y de acuerdo a lo reportado por Yu y col. (2019) en cultivos de macrófagos RAW 264.7 activados con LPS (1 µg/mL) y suplementados con 30 µM de RSV, hubo una disminución en la expresión relativa de iNOS, con lo que se puede inferir que la suplementación con RSV también disminuye los niveles de NO respecto a los reportados para el cultivo control. Por otro lado, Ryyti y col. (2022) reportan en su estudio que cultivos de macrófagos murinos J774 polarizados hacia el fenotipo M1 mediante estimulación con LPS (10 ng/mL) presentaron una disminución en la producción de NO de manera dependiente de la dosis de RSV después de 24 h de incubación, mostrando hasta un 42 % de disminución en la producción de NO con RSV 10 µM.

Finalmente, respecto a los macrófagos incubados con 30 mM de glucosa con insulina y suplementados con RSV, si bien, no se observa una disminución en la producción de NO como reportan Yu y col. (2019) y Ryyti y col. (2022), si se observa una normalización de los valores respecto al control de glucosa estándar lo que sugiere un efecto protector del RSV sobre estas condiciones.

Diferentes contextos metabólicos influyen de manera particular sobre el espectro de polarización y la actividad de los macrófagos. En un estado de obesidad, por ejemplo, los macrófagos del tejido adiposo son activados por varios estímulos metabólicos como los ácidos grasos libres y niveles elevados de glucosa e insulina. Es por ello que, dependiendo del contexto genético y fisiológico, la vía PI3K/Akt modula la respuesta de diversas señales metabólicas e inflamatorias en los macrófagos, ya que se encarga de transducir señales de varios receptores, incluidos los receptores de insulina (RI e IGF1R) y los TLR (Acosta-Martinez & Cabail, 2022).

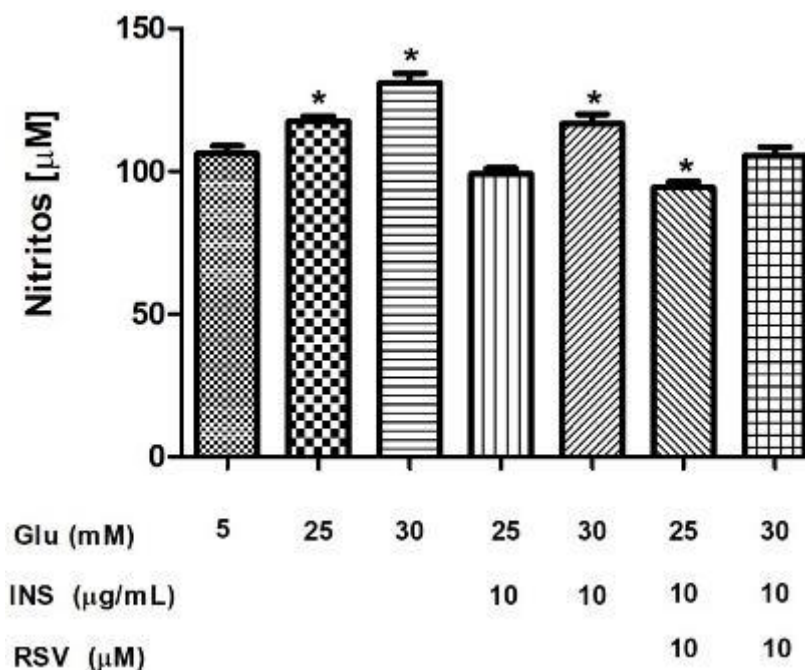


Figura 5. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre la cuantificación de óxido nítrico en el medio de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV. * Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

6.4 Efecto del estímulo sostenido de glucosa e insulina alta en cultivo de macrófagos RAW 264.7 suplementados con resveratrol sobre el estrés oxidativo (GSH).

En este tipo de células sensibles a la hiperglucemia una carga excesiva de glucosa constante desencadena la formación desregulada de ERO causantes del estrés oxidativo intracelular y activadores del factor NF- κ B que regula positivamente la expresión de citocinas proinflamatorias (Rendra y col., 2019). En este contexto, el GSH protege contra el estrés oxidativo mediante la eliminación o neutralización de ERO y ERN y la inhibición de la peroxidación lipídica; así mismo, el GSH es el antioxidante más abundante en las células aeróbicas (Owen & Butterfield, 2010). Por lo anterior, se evaluó el estado antioxidante de los

macrófagos RAW 264.7 en condiciones de hiperglucemia estimulados con insulina alta (10 $\mu\text{g/mL}$) y suplementados con RSV 10 μM .

Se encontró que en los macrófagos bajo condiciones de 25 mM de glucosa en las 3 diferentes condiciones utilizadas en este estudio (25 mM de glucosa, 25 mM de glucosa + insulina y 25 mM de glucosa + insulina + RSV) se presentó un aumento de GSH de hasta 12.4 veces respecto a las células control con 5 mM de glucosa; mientras que, en los macrófagos bajo las condiciones de glucosa más elevadas sin resveratrol (30 mM, 30mM + insulina), los valores de GSH fueron estadísticamente similares al valor de los macrófagos control (Figura 6).

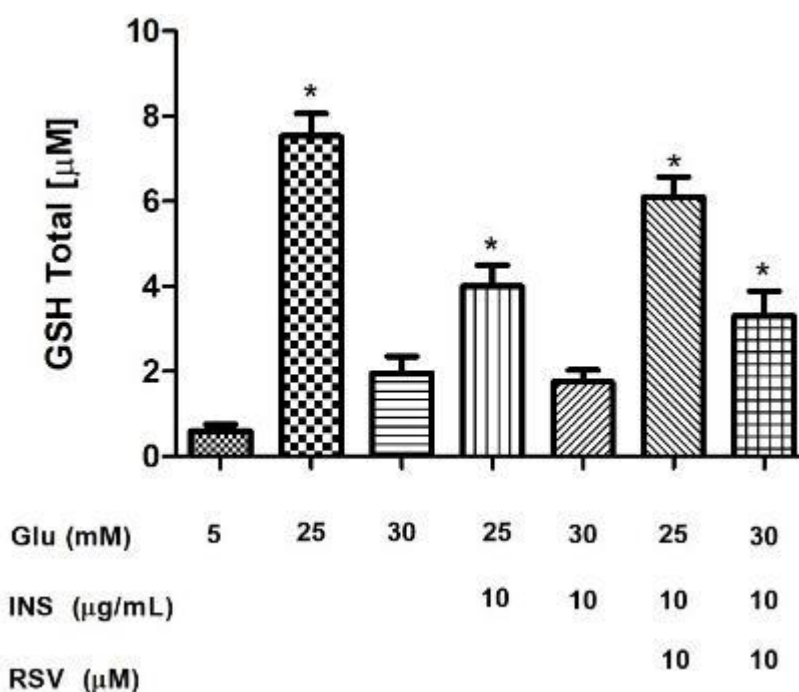


Figura 6. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre el contenido intracelular de GSH total de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV. *Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

De manera similar a lo observado en este estudio con los macrófagos a 25 mM de glucosa, Manríquez y col. (2023) reportan que los macrófagos incubados con

glucosa alta (25 mM) y estimulados con 60 ng/mL de LPS elevan sus niveles de GSH intracelular 3.2 veces más en comparación con los macrófagos control en 5 mM de glucosa sin estimulación de LPS. Además, estos autores mencionan que los niveles de GSH en los macrófagos incubados con 25 mM de glucosa, 60 ng/mL de LPS y suplementados con DT3 o RSV (a las diferentes concentraciones) se mantienen bajos en comparación con los macrófagos en glucosa alta (25 mM) y 60 ng/mL de LPS, pero aún mantienen niveles superiores a las células control en glucosa 5 mM sin LPS.

Interesantemente, y similar al fenómeno observado en este estudio con los macrófagos incubados a 30 mM de glucosa y 30 mM de glucosa + insulina, Manríquez y col. (2023) reportan que, cuando los macrófagos en glucosa alta son estimulados con 100 ng/mL de LPS, se observa una reducción en el contenido de GSH, acercándose al nivel de los macrófagos control no estimulados con LPS. Por lo anterior, inferimos que ambos estímulos ejercen un efecto de intensidad comparable sobre los macrófagos de manera que los niveles intracelulares de GSH se ven afectados.

Finalmente, Manríquez y col. (2023) reportan que los macrófagos bajo condiciones de 25 mM de glucosa + 60 ng/mL de LPS y suplementados con D3T o RSV muestran niveles elevados de GSH respecto a los macrófagos control en 5 mM de glucosa sin LPS y a los macrófagos en 25 mM de glucosa sin LPS. En comparación con estos resultados, en nuestro estudio se observa que el RSV incrementa los niveles de GSH en los macrófagos bajo condiciones de alta glucosa e insulina, en relación con las células control (5 mM de glucosa), aunque dicho efecto pareciera atenuarse en la condición con 30 mM de glucosa.

Kim y col. (2004) reportan en cultivos primarios de hepatocitos de rata suplementados con 1 µg/mL de insulina en condiciones de normoglucemia un aumento de hasta 160 % en la actividad de la enzima GCL (glutamato-cisteína ligasa), enzima limitante en la biosíntesis de GSH, resultando en un aumento de hasta 40 % en los niveles de GSH. Además, en su estudio demuestran que la inhibición de la enzima PI3K mediante la adición de wortmannin, previene el

incremento previamente observado en los niveles de GSH mediados por la insulina. En este sentido, su estudio sugiere que el incremento de GSH está mediado por la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR por la acción de la insulina que, a su vez, induce la expresión de la enzima GCL. Por otro lado, Okouchi y col. (2006) utilizaron la línea celular de cerebro (IHEC) cultivada en 25 mM de glucosa por una semana y tratada con 100 nM de insulina por 24 h obteniendo resultados consistentes con el efecto citoprotector de la insulina mediado por la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. Adicionalmente, sus resultados sugieren que el tratamiento con insulina es capaz de inducir la translocación de Nrf2, mediante la vía PI3K/Akt/mTOR. De esta manera, los investigadores concluyen que la insulina, en niveles elevados de glucosa (25 mM) de manera crónica o sostenida, aumenta la actividad de GCL, incrementando así los niveles intracelulares de GSH. Los resultados previos, en conjunto con los resultados de Manríquez y col. (2023), coinciden con los resultados obtenidos en este estudio para los macrófagos bajo condiciones de 25 mM, en donde observamos un aumento en los niveles de GSH respecto a los macrófagos control, aunque menos intenso en comparación con los cultivos estimulados con LPS, particularmente LPS 60 ng/mL (Manríquez y col., 2023). Además, los estudios previos ofrecen una posible explicación sobre el potencial efecto de la insulina en los niveles de GSH intracelular, al menos hasta 25 mM de glucosa como lo reportan Okouchi y col. (2006). Por el contrario, se ha reportado una disminución del nivel de GSH a 25 mM (Kanikarlay y col., 2019); sin embargo, esta diferencia podría deberse a la falta de suplementación con insulina, como se muestra en lo reportado en los estudios anteriores.

Estudios previos reportan una disminución en los niveles de GSH en individuos con DT2; además, esta disminución se ha asociado con varias enfermedades proinflamatorias crónicas como los padecimientos cardiovasculares y el síndrome metabólico (Sekhar y col., 2011; Hristov, 2022). Esta disminución en el nivel de GSH suele atribuirse a una limitación en la suplementación del sustrato necesario (cisteína y glicina) para síntesis de GSH, la disfunción mitocondrial, un defecto en la vía de biosíntesis del GSH debido a las alteraciones metabólicas presentes en la inflamación crónica o a un incremento en la tasa de utilización de GSH respecto

a su tasa de síntesis (Kanikarla y col., 2019). En comparación con la condición de 25 mM de glucosa que eleva los niveles de GSH (Figura 6), la glucosa alta 30 mM pareciera ejercer el efecto contrario. En la Figura 6 se observa que los niveles de GSH en los macrófagos bajo las distintas condiciones en 30 mM de glucosa se acercan al valor obtenido para los macrófagos control. Respecto a lo anterior, Park y col. (2011) observaron un aumento de las ERO y una disminución de los niveles de GSH, respecto al control, en células epiteliales glomerulares (GEC) tratadas con 30 mM de glucosa por 24 h; sin embargo, el pretratamiento con 100 μ M de galato de epigallocatequina-3 (EGCG, el polifenol antioxidante más potente del té verde) por 2 h disminuyó significativamente la producción de ERO y aumentó el nivel de GSH respecto a las células control 5 mM de glucosa. En otro estudio con la línea celular epitelial EA.hy926 tratada con 30 mM de glucosa por 24 h se observó una disminución del 50 % en el nivel intracelular de GSH respecto al control; por el contrario, el cotratamiento con el extracto de *Vochysia rufa* (10 μ g/mL) recuperó parcialmente el nivel de GSH respecto a las células control (Moura y col., 2017).

En este sentido, y tomando en consideración los hallazgos descritos previamente, nuestros resultados coinciden con la disminución en los niveles de GSH en los macrófagos cultivados en 30 mM de glucosa; sin embargo, al suplementar el cultivo con RSV y en presencia de insulina, los niveles de GSH logran recuperarse, aunque en menor medida que para las condiciones en 25 mM de glucosa.

Se propone que la diferencia en el posible efecto de la insulina sobre la atenuación en la disminución de los niveles de GSH bajo las condiciones 25 mM y 30 mM de glucosa se debe, como se menciona anteriormente, a que la activación de la vía PI3K/Akt en los macrófagos depende del tipo y la intensidad de los estímulos en el microambiente celular. En este contexto, está bien establecido que, para mantener la homeostasis y un estado de salud, es esencial la modulación de la glucemia y la captación celular de glucosa. La homeostasis metabólica a la que están sujetas las células mediante un equilibrio redox se ve interrumpida por la

hiperglucemia causante de trastornos metabólicos mediante la activación de vías aberrantes que promueven el estrés oxidativo.

Particularmente, la vía de los polioles que, en condiciones hiperglucémicas se activa y se ha estimado que utiliza más del 30 % de la glucosa del cuerpo, contribuye de manera importante al estrés oxidativo. Su primera reacción consume NADPH, disminuyéndolo, lo que a su vez disminuye el nivel de GSH debido a que la glutatión reductasa necesita del NADPH para regenerar el GSH, comprometiendo la capacidad antioxidante celular (Yan, 2014). En este sentido, creemos que los sistemas antioxidantes en los macrófagos a 30 mM de glucosa se ven superados por el aumento del estrés oxidativo, como las ERO y ERN, sumado a la posible disfunción mitocondrial causada por el exceso de radicales libres.

6.5 Efecto del estímulo sostenido de glucosa e insulina elevadas en cultivo de macrófagos RAW 264.7 suplementados con resveratrol sobre la peroxidación lipídica (MDA).

El ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) está ampliamente considerado como indicador de los niveles de estrés oxidativo en muestras biológicas, ya que este ensayo nos permite medir la peroxidación de lípidos mediante la detección de malondialdehído (MDA) (De León y Borges, 2020). En este sentido, los macrófagos RAW 264.7 estimulados con 25 mM y 30 mM de glucosa (sin insulina) mostraron los niveles más altos de MDA (hasta 32 %) que los macrófagos control en glucosa 5 mM; un comportamiento similar se observó para los macrófagos RAW 264.7 estimulados además con insulina en cuyo caso se obtuvo un aumento de hasta 41 % respecto a las células control (Figura 7).

Interesantemente para los macrófagos suplementados con RSV tanto 25 mM como 30 mM de glucosa tuvieron un aumento en el nivel de MDA de 45.5 % y 29 % respectivamente frente a las células control en glucosa estándar (Figura 7).

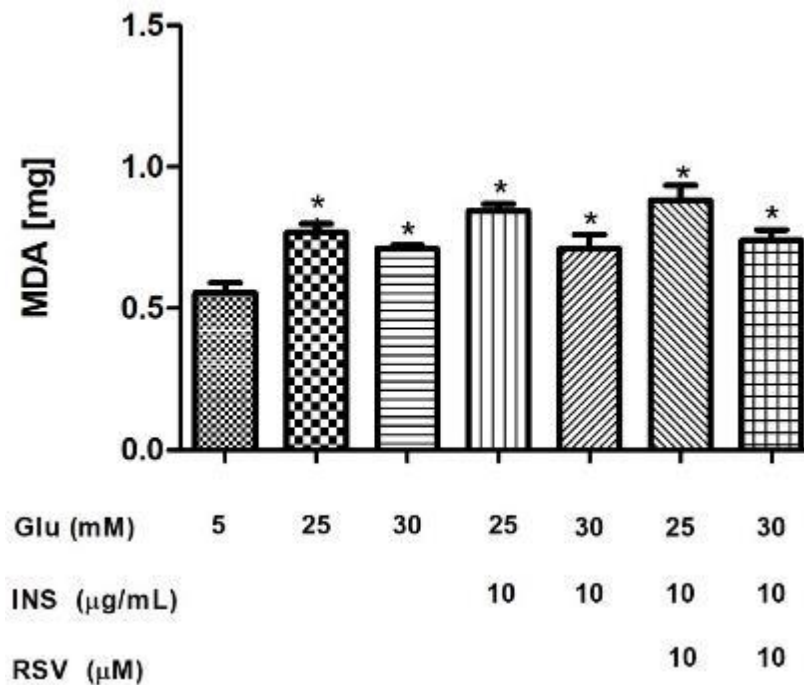


Figura 7. Efecto de la estimulación sostenida (7 días) con concentraciones elevadas de glucosa e insulina sobre el contenido de MDA en el medio de cultivo de la línea celular RAW 264.7 suplementada con RSV. *Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Manríquez-Núñez y col. (2023) en cuyo estudio se observó que los macrófagos RAW 264.7 en glucosa 25 mM y estimulados con 60 y 100 ng/mL de LPS mostraron niveles más altos de MDA que los macrófagos control en glucosa estándar sin LPS. Además, los autores reportan que los niveles de MDA se redujeron con la suplementación con D3T y RSV (2.5 µM, 5 µM y 10 µM) a 60 y 100 ng/mL de LPS en 25 mM de glucosa respecto a las células en 25 mM de glucosa con LPS; sin embargo, los niveles de MDA se mantuvieron aún altos respecto a las células en 25 mM sin LPS y a las células control en 5 mM de glucosa sin LPS.

En su estudio, Ding y col. (2019) cultivaron células HepG2 en 30 mM de glucosa durante 12 h y observaron un aumento significativo en el nivel de MDA en

comparación con las células del grupo control (5 mM de glucosa). Aunque son escasos los estudios en los que se reporta el contenido de MDA en cultivo celular en condiciones de hiperglucemia, se puede observar que los datos obtenidos hasta el momento coinciden con los resultados de nuestro estudio que muestran un aumento general de los niveles de MDA en condiciones de hiperglucemia. En este caso, la adición de RSV al medio no ejerce un efecto atenuante sobre los niveles de MDA para condiciones hiperglucémicas, coincidiendo con Manríquez-Núñez y col. (2023) quienes reportan que la suplementación del D3T mostró mejores resultados bajo estas condiciones que el RSV, el cual tuvo un mejor efecto en condiciones de glucosa estándar.

La determinación de los niveles de MDA en el medio de cultivo de macrófagos RAW 264.7, bajo diferentes condiciones del medio de cultivo, permite evaluar el aumento o disminución en los procesos de peroxidación lipídica mediados por estrés oxidativo inducido por una condición hiperglucémica e hiperinsulinémica sostenida. Así mismo, los niveles de MDA en el medio de cultivo permiten dilucidar la cantidad de metabolitos potencialmente proinflamatorios secretados por los macrófagos que pueden interactuar con las células circundantes en un tejido, por ejemplo, el tejido adiposo.

6.6 Inducción de marcadores moleculares del fenotipo M2 (IL-10) y M1 (IL-6) por RSV en macrófagos RAW 264.7 en condiciones de hiperglucemia y suplementados con insulina alta.

En la Figura 8 se muestran los cambios en la expresión relativa de la citocina proinflamatoria IL-6 en los macrófagos bajo las distintas condiciones del medio. Se encontró que la IL-6 mantuvo un valor similar al de los macrófagos control para 25 mM de glucosa sin ningún estímulo extra. Sin embargo, para el resto de condiciones se observó un aumento en los niveles de IL-6 respecto al control, siendo 30 mM de glucosa con insulina la condición que más elevó la expresión relativa de esta interleucina con un aumento de hasta 105 % respecto al control.

En general, los resultados obtenidos sobre la expresión relativa de IL-6 en macrófagos son similares a los datos reportados en diversos estudios (Pavlou y col., 2018; Suzuki y col. 2021; Manríquez-Núñez y col., 2023), en los que se observa que la estimulación de las células únicamente con altas concentraciones de glucosa (25 mM) en un periodo sostenido de tiempo (7 días), no afecta la expresión relativa de IL-6 en comparación con los macrófagos control (5 mM de glucosa).

Por otra parte, en la Figura 8 se observa que en macrófagos suplementados con RSV en 30 mM de glucosa disminuyó la expresión relativa de la IL-6 en un 20 % con respecto a las células en 30 mM + insulina, aunque se conserva por encima de los macrófagos control (5 mM de glucosa). En general, los macrófagos en medio hiperglucémico (aún con insulina y RSV) presentaron una expresión relativamente alta de IL-6 respecto a las células control con 5 mM de glucosa. De manera interesante, los resultados obtenidos sugieren que la adición de insulina podría ejercer un efecto potenciador sobre la expresión relativa de la IL-6, ya que macrófagos bajo las condiciones de medio a las que se añadió la insulina con o sin RSV, expresaron niveles más elevados de IL-6.

Se ha demostrado en estudios previos que una exposición a niveles altos de glucosa (25 mM) a corto plazo (3-48 h) más la adición de LPS potencia la activación de macrófagos RAW264.7 (Hwang y col., 2017; Cantuária y col., 2018). Suzuki y col. (2021) expusieron células RAW 264.7 a glucosa alta (22 o 40 mM) durante 7 días y encontraron un notable incremento en la expresión relativa de diversas citocinas proinflamatorias a 40 mM de glucosa (independiente de la presencia de LPS), entre las cuales reportan a la IL-6. De manera similar a Suzuki y col. (2021), en este estudio se investigó el impacto de una exposición más prolongada (7 días) a niveles altos de glucosa (25 mM y 30 mM) e insulina sobre la polarización de los macrófagos RAW 264.7. Por otro lado, Zhang y col. (2025) en su estudio con la línea celular THP-1 evaluaron los efectos de la alta glucosa incubando los macrófagos por 24 h con glucosa 30 mM y encontraron que el tratamiento hiperglucémico aumentó los niveles de expresión de citocinas como: IL-1 β , IL-6 y TNF- α asociadas al fenotipo M1. Estos resultados coinciden con los

datos reportados en nuestro estudio respecto al aumento de la expresión relativa de la IL-6 en medio hiperglucémico.

Los resultados observados en la Figura 8 con respecto a la suplementación con insulina son de gran relevancia, ya que muestran que la insulina podría ejercer un efecto significativo sobre la expresión relativa de la IL-6, favoreciendo un perfil proinflamatorio en los macrófagos. Este efecto es tal que, incluso con la adición de un compuesto bioactivo como el RSV, no es capaz de disminuir estos niveles, como se muestra en otros estudios. En este sentido, Manríquez-Núñez y col. (2023) reportan que la adición de RSV en glucosa 25 mM, sin insulina, disminuye de manera importante de la expresión relativa de IL-6, bastante cercana a los macrófagos control (5 mM de glucosa sin LPS) incluso con la adicción de LPS (60 ng/mL).

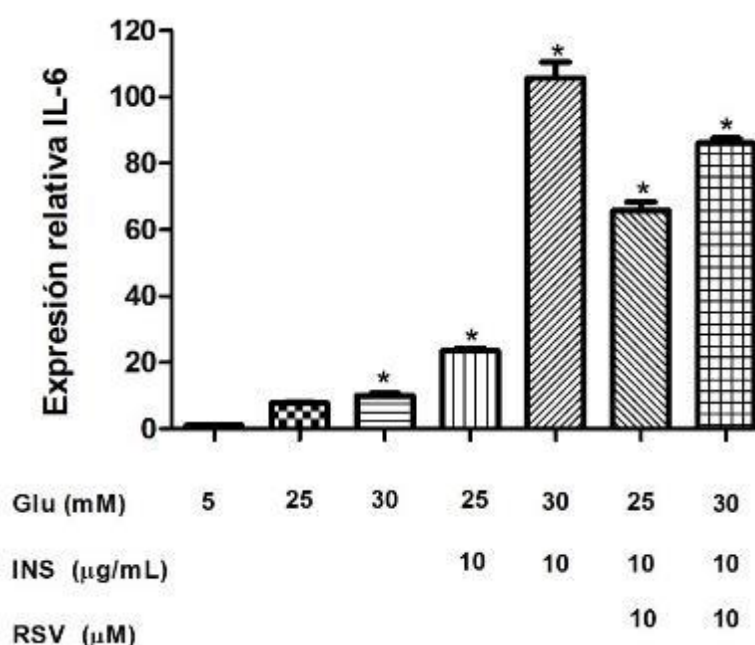


Figura 8. Expresión relativa del gen proinflamatorio IL-6 en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación sostenida (7 días) con altas concentraciones de glucosa e insulina y suplementada con RSV. *Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

En cuanto a la IL-10 (Figura 9), la expresión relativa de esta interleucina se vio disminuida en los macrófagos bajo todas las condiciones de hiperglucemia evaluadas respecto a las células control, alcanzando una disminución de hasta 98 % en 30 mM + insulina, incluso la suplementación con RSV no logró normalizar la expresión relativa de la IL-10 en ninguna condición. Cabe destacar que estas mismas condiciones presentaron los niveles más elevados de IL-6 respecto a las células control. Torres Castro y col., (2016) aislaron monocitos a partir de voluntarios varones sanos sin enfermedad metabólica, los maduraron a macrófagos y posteriormente los incubaron con glucosa 15 mM por 3 días, encontrando una reducción de 3 veces en la secreción promedio de IL-10, en comparación con las células expuestas a 5 mM de glucosa. Este resultado se alinea con lo mostrado en nuestro estudio (Figura 9), donde niveles de glucosa elevados (25 mM y 30 mM) disminuyen la expresión relativa de la IL-10 en macrófagos.

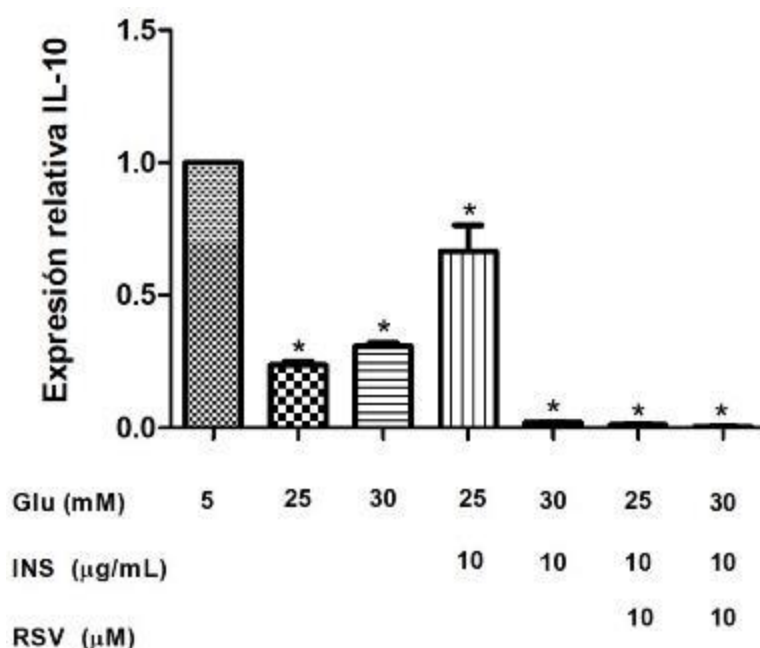


Figura 9. Expresión relativa del gen antiinflamatorio IL-10 en la línea celular RAW 264.7 bajo estimulación sostenida (7 días) con altas concentraciones de glucosa e insulina y suplementada con RSV. *Indica diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control (Glu 5 mM sin insulina). Glu: glucosa, INS: insulina, RSV: resveratrol.

Los resultados obtenidos también coinciden con lo reportado por Manríquez-Núñez y col. (2023), quienes, si bien no reportan una disminución en la expresión de la IL-10 en macrófagos bajo condiciones de glucosa alta (25 mM), no encuentran una diferencia significativa de los macrófagos incubados con 25 mM de glucosa suplementados con RSV y LPS 60 ng/mL respecto a las células control (5 mM + LPS).

Es importante destacar que la mayoría de los estudios en la literatura reportan un notable aumento de la IL-10, aparentemente propiciado por la suplementación con polifenoles, entre ellos el RSV, promoviendo la polarización de los macrófagos a M2; sin embargo, es importante recordar que las distintas condiciones de cultivo impactan en el dinamismo de la polarización de los macrófagos. En este estudio, particularmente la adición de insulina al medio de cultivo pareciera afectar de manera importante los niveles de expresión de IL-6 e IL-10 en los macrófagos suplementados con RSV bajo condiciones de glucosa alta. Hasta donde sabemos, no existen estudios disponibles en macrófagos con condiciones similares a las propuestas aquí; por ello, el mecanismo mediante el cual sucede este fenómeno no queda completamente claro. De los estudios derivados de animales podríamos inferir la participación de vías como PI3K/Akt y MAPK/ERK que podrían comenzar a explicar los resultados presentados en este estudio.

Dado que una de las principales funciones de los macrófagos es la inmunovigilancia, ser capaces de censar su microambiente y activarse adecuadamente ante la detección de alteraciones patológicas es de suma importancia. Por lo anterior, cuando se polarizan, una de sus principales características es la reprogramación de su metabolismo energético dependiendo de sus necesidades. Los macrófagos son células capaces de diferenciarse en subconjuntos especializados mediante las señales del microambiente; por lo tanto, no es de extrañar que una disponibilidad abundante de sustrato energético (hiperglucemia) afecte su metabolismo estimulando la polarización M1, cuya principal vía metabólica es la glucólisis.

En diversos estudios se ha reportado como el nivel de glucosa influye en la inducción del fenotipo M1 en macrófagos. En este contexto, Jia y col. (2015) midieron los niveles de ARNm de IL-1 β y TNF- α en células RAW 264.7 estimuladas con glucosa 30 mM y encontraron que los niveles de ambas citocinas se elevan significativamente. Cantuária y col. (2018) reportaron que en cultivo de células RAW 264.7 en medio hiperglucémico (24 mM glucosa) las citocinas proinflamatorias IL-1 α e IL-6 se vieron reguladas positivamente, aumentando su producción. Por otro lado, se ha demostrado que la hiperglucemia aumenta la producción de EROS en los macrófagos al inicio y durante la progresión de la DT2, lo que favorece la inducción del fenotipo proinflamatorio M1. Además, se reporta que una exposición incluso a corto a plazo a niveles elevados de glucosa induce la polarización hacia el fenotipo proinflamatorio M1, puesto que estos macrófagos dependen en gran medida de la glucólisis como fuente de energía (Dissanayake y col., 2021; Tacconi y col., 2024).

En general, el sobrepeso y la obesidad son condiciones asociadas a una reducción en la calidad de vida, una esperanza de vida más corta y un aumento en los costos de atención médica, ya que, a pesar de su naturaleza leve, la inflamación crónica del tejido adiposo visceral afecta negativamente el funcionamiento de órganos remotos, lo que se considera causa de las complicaciones asociadas a estas condiciones (Kawai y col., 2021). Por lo anterior, es de gran importancia determinar la acción de compuestos bioactivos como el RSV capaces de inhibir la vía NF- κ B atenuando de esta manera la cascada proinflamatoria.

En experimentos previos con macrófagos RAW 264.7 se han evaluado las características que presentan al estimularlos únicamente con medios altos en glucosa o con la adición de LPS. Mientras que, en el presente estudio proponemos la adición de glucosa alta e insulina a los cultivos con el objetivo de generar condiciones que se asemejen de manera más completa a las presentes en los individuos con dieta hipercalórica y, finalmente suplementamos con RSV, un conocido polifenol del cual se han reportado sus propiedades antiinflamatorias.

La insulina es la principal molécula encargada de mediar la absorción de glucosa, uno de los carbohidratos más abundantes de las dietas actuales, en una variedad de tejidos de manera que, a una mayor ingesta de carbohidratos, una mayor cantidad de glucosa es metabolizada en las células aumentando la síntesis de ácidos grasos para la formación de triglicéridos que se almacenan principalmente en los adipocitos viscerales y subcutáneos. La sobrecarga nutricional conduce a la hipertrofia e hiperplasia de adipocitos, lo cual viene acompañado de un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios que favorecen la polarización a M1 de los macrófagos residentes del tejido adiposo y, en consecuencia, predispone a los individuos con sobrepeso u obesidad al desarrollo de trastornos metabólicos e inflamación crónica de bajo grado (Rakotoarivelo y col., 2018; Pelczyńska y col., 2023.). Esta sobrecarga nutricional es capaz de inducir una mayor cantidad de EROS y síntesis de óxido nítrico inducible (iNOS) que favorecen el estrés oxidativo de la célula aumentando la cascada proinflamatoria (Rakotoarivelo y col., 2018).

Actualmente se explora el uso de diversos fitoquímicos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias como parte de las nuevas estrategias para combatir la obesidad y sus desórdenes metabólicos asociados. Por lo tanto, en este estudio se suplementaron los cultivos de macrófagos RAW 264.7 con RSV debido a los diversos efectos benéficos en la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos como la obesidad. Por un lado, a través de la inhibición de vías proinflamatorias como NF- κ B y, por otro lado, debido a la inducción de factores como PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina), AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y SIRT1 (sirtuina 1) que promueven la sobreexpresión de enzimas antioxidantes endógenas como SOD y CAT y estimulan la producción de GSH intracelular (Vasileva y col., 2018; Meng y col., 2020).

Finalmente, derivado de los hallazgos anteriormente mencionados en este estudio, y dadas las características de nuestra metodología (macrófagos incubados a largo plazo (7 días) con niveles altos de glucosa e insulina) que colocan a los macrófagos en un entorno similar a las condiciones de hiperglucemia en animales e individuos diabéticos u obesos, se considera que

este sistema sería un modelo *in vitro* más acertado para el estudio del comportamiento de los macrófagos en patologías como las mencionadas.

VII. CONCLUSIÓN

Este trabajo propuso un enfoque novedoso para el estudio de procesos inflamatorios en macrófagos RAW 264.7 mediante un modelo *in vitro* que incluye condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia. A diferencia de estudios previos que utilizan estímulos agudos y omiten la insulina, este modelo simula de forma más realista un entorno de inflamación crónica de bajo grado, como el que se presenta en el contexto de una dieta hipercalórica y resistencia a la insulina. Los resultados muestran que la combinación de glucosa elevada e insulina promueve un perfil proinflamatorio sostenido, caracterizado por aumentos en NO, MDA e IL-6, y resistencia al efecto antiinflamatorio del resveratrol (RSV), sin mejora en los niveles de IL-10. No obstante, se observó una posible mejora en los niveles de GSH atribuible a RSV e insulina.

El medio con 30 mM de glucosa se identificó como el más desafiante para revertir la inflamación, incluso con la adición de polifenoles. Aunque los modelos *in vitro* no replican completamente la complejidad del entorno metabólico humano, permiten aislar y analizar mecanismos clave que participan en fenómenos complejos como la polarización de macrófagos. Comprender estos procesos es esencial para optimizar el uso de compuestos bioactivos en la prevención y tratamiento de la inflamación crónica de bajo grado.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Martinez, M. & Cabail, M.Z. (2022). The PI3K/Akt pathway in meta-inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(23): 15330. <https://doi.org/10.3390/ijms232315330>

Almeida-da-Silva, C.L.C., Savio, L.E.B., Coutinho-Silva, R. & Ojcius, D.M. (2023). The role of NOD-like receptors in innate immunity. *Frontiers in Immunology*. 14: 1122586. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1122586>

Alvarenga, L., Saldanha, J.F., Stockler-Pinto, M.B., Fouque, D., Soulage, C.O. & Mafra, D. (2023). Effects of resveratrol on inflammation and oxidative stress induced by the uremic toxin indoxyl sulfate in murine macrophage-like RAW264.7. *Biochimie*. 213: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.05.001>

Austermann, J., Roth, J. & Barczyk-Kahlert, K. (2022). The good and the bad: monocytes' and macrophages': diverse functions in inflammation. *Cells*. 11(12): 1979. <https://doi.org/10.3390/cells11121979>

Bajgar, A. & Krejčová, G. (2023). On the origin of the functional versatility of macrophages. *Frontiers in Physiology*. 14: 1128984. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1128984>

Bouzazi, D., Mami, W., Mosbah, A., Marrakchi, N., Ben Ahmed, M. & Messadi, E. (2023). Natriuretic-like peptide Lebetin 2 mediates M2 macrophage polarization in LPS-activated RAW 264.7 cells in an IL-10-dependent manner. *Toxins*. 15: 298. <https://doi.org/10.3390/toxins15040298>

Cantuária, A.P.C., Figueiredo, T.M., Freire, M.S., Lima, S.M.F., Almeida, J.A., Franco, O.L. & Rezende, T.M.B. (2018). The effects of glucose concentrations associated with lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulus on mediators' production of RAW 264.7 cells. *Cytokine*. 107: 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.008>

Carlini, V., Noonan, D.M., Abdalalem, E., Goletti, D., Sansone, C., Calabrone, L., & Albin, A. (2023). The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*. 14: 1161067. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161067>

Chaintreuil, P., Kerrenneur, E., Bourgoin, M., Savy, C., Favreau, C., Robert, G., Jacquelin, A. & Auberger, P. (2023). The generation, activation, and polarization of monocyte-derived macrophages in human malignancies. *Frontiers in Immunology*. 14: 1178337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178337>

Chen, X., Yu, H., Li, Z., Ye, W., Liu, Z., Gao, J., Wang, Y., Li, X., Zhang, L., Alenina, N., Bader, M., Ding, H., Li, P. & Aung, L. H. H. (2022). Oxidative RNA damage in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Frontiers in Physiology*. 13: 725919. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.725919>

Cinelli, M.A., Do, H.T., Miley, G.P. & Silverman, R. B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*. 40(1): 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>

Cordiano, R., Di Gioacchino, M., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangemi, S. & Minciullo, P.L. (2023). Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update. *Molecules*. 28(16): 5979. <https://doi.org/10.3390/molecules28165979>

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. *Pharmacological Reviews*. 70: 348–383. doi:10.1124/pr.117.014753.

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

Ding, X., Jian, T., Wu, Y., Zuo, Y., Li, J., Lv, H., Ma, L., Ren, B., Zhao, L., Li, W. & Chen, J. (2019). Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 110: 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.018>

Dissanayake, W.C., Oh, J.K., Sorrenson, B. & Shepherd, P.R. (2021). Glucose regulates expression of pro-inflammatory genes, IL-1 β and IL-12, through a mechanism involving hexosamine biosynthesis pathway-dependent regulation of α -E catenin. *Bioscience Reports*. 41(7): BSR20211066. <https://doi.org/10.1042/BSR20211066>

Do Carmo, M.A.V., Granato, D. & Azevedo, L. (2021). Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: a cell-based point of view. *Advances in Food and Nutrition Research*. 98: 253–280. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.010>

Edgar, L., Akbar, N., Braithwaite, A.T., Krausgruber, T., Gallart-Ayala, H., Bailey, J., Corbin, A.L., Khoiratty, T.E., Chai, J.T., Alkhalil, M., Rendeiro, A.F., Ziberna, K., Arya, R., Cahill, T.J., Bock, C., Laurencikiene, J., Crabtree, M.J., Lemieux, M.E., Riksen, N. P., Netea, M.G. & Choudhury, R.P. (2021). Hyperglycemia induces trained immunity in macrophages and their precursors and promotes atherosclerosis. *Circulation*. 144(12): 961–982. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046464>

Fonseca, J., Moradi, F., Valente, A.J.F. & Stuart, J.A. (2018). Oxygen and glucose levels in cell culture media determine resveratrol's effects on growth, hydrogen peroxide production, and mitochondrial dynamics. *Antioxidants*. 7(11): 157. <https://doi.org/10.3390/antiox7110157>

Forcina, L., Franceschi, C. & Musarò, A. (2022). The hormetic and hermetic role of IL-6. *Ageing Research Reviews*. 80: 101697. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101697>

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D.W., Fasano, A., Miller, G.W., Miller, A.H., Mantovani, A., Weyand, C.M., Barzilai, N., Goronzy, J.J., Rando, T.A., Effros, R.B., Lucia, A., Kleinstreuer, N. & Slavich, G.M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, 25(12). 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(23): 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

Ghosh, A., & Shcherbik, N. (2020). Effects of oxidative stress on protein translation: implications for cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(8): 2661. <https://doi.org/10.3390/ijms21082661>

Goodfellow, M.J., Borcar, A., Proctor, J.L., Greco, T., Rosenthal, R.E. & Fiskum, G. (2020). Transcriptional activation of antioxidant gene expression by Nrf2 protects against mitochondrial dysfunction and neuronal death associated with acute and chronic neurodegeneration. *Experimental Neurology*. 328: 113247. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113247>

González, P., Lozano, P., Ros, G. & Solano, F. (2023). Hyperglycemia and oxidative stress: an integral, updated and critical overview of their metabolic interconnections. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(11): 9352. <https://doi.org/10.3390/ijms24119352>

Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews in Immunology*. 3(1): 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>

Guo, L., Zhang, X., Lv, N., Wang, L., Gan, J., Jiang, X. & Wang, Y. (2023). Therapeutic role and potential mechanism of resveratrol in atherosclerosis:

TLR4/NF- κ B/HIF-1 α . *Mediators of Inflammation*. 2023: 1097706. <https://doi.org/10.1155/2023/1097706>

Hou, F., Xiao, K., Tang, L. & Xie, L. (2021). Diversity of macrophages in lung homeostasis and diseases. *Frontiers in Immunology*. 12: 753940. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.753940>

Hristov B.D. (2022). The role of glutathione metabolism in chronic illness development and its potential use as a novel therapeutic target. *Cureus*. 14(9): e29696. <https://doi.org/10.7759/cureus.29696>

Hwang, J.S., Kwon, M.Y., Kim, K.H., Lee, Y., Lyoo, I.K., Kim, J.E., Oh, E.S. & Han, I.O. (2017). Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated iNOS induction is increased by glucosamine under normal glucose conditions but is inhibited by glucosamine under high glucose conditions in macrophage cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 292(5): 1724–1736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737940>

Ieronymaki, E., Daskalaki, M.G., Lyroni, K. & Tsatsanis, C. (2019). Insulin signaling and insulin resistance facilitate trained immunity in macrophages through metabolic and epigenetic changes. *Frontiers in Immunology*. 10: 1330. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01330>

Kolliniati, O., Ieronymaki, E., Vergadi, E. & Tsatsanis, C. (2022). Metabolic regulation of macrophage activation. *Journal of Innate Immunity*. 14(1): 51–68. <https://doi.org/10.1159/000516780>

Kawai, T., Autieri, M.V. & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 320(3): C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>

Kim, S.K., Woodcroft, K.J., Khodadadeh, S.S. & Novak, R.F. (2004). Insulin signaling regulates gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression in

primary cultured rat hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 311(1): 99–108. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.070375>

Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J. & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski Merkuriusz lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 48(284): 124–127.

Jia, Y., Zheng, Z., Wang, Y., Zhou, Q., Cai, W., Jia, W., Yang, L., Dong, M., Zhu, X., Su, L. & Hu, D. (2015). SIRT1 is a regulator in high glucose-induced inflammatory response in RAW264.7 cells. *PloS one*. 10(3): e0120849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120849>

Kanikarla-Marie, P., Micinski, D. & Jain, S.K. (2019). Hyperglycemia (high-glucose) decreases L-cysteine and glutathione levels in cultured monocytes and blood of Zucker diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 459(1-2): 151-156. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03558-z>

Lendeckel, U., Venz, S. & Wolke, C. (2022). Macrophages: shapes and functions. *Chemtexts*. 8(2): 12. <https://doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4>

Li, D., Liu, Q., Sun, W., Chen, X., Wang, Y., Sun, Y. & Lin, L. (2018). 1,3,6,7-tetrahydroxy-8-prenylxanthone ameliorates inflammatory responses resulting from the paracrine interaction of adipocytes and macrophages. *British Journal of Pharmacology*. 175(10): 1590–1606. <https://doi.org/10.1111/bph.14162>

Liao, H., Li, Y., Zhang, X., Zhao, X., Zheng, D., Shen, D., & Li, R. (2020). Protective effects of thalidomide on high-glucose-induced podocyte injury through in vitro modulation of macrophage M1/M2 differentiation. *Journal of Immunology Research*. 8263598. <https://doi.org/10.1155/2020/8263598>

Licá, I.C.L., Frazão, G.C.C.G., Nogueira, R.A., Lira, M.G.S., dos Santos, V.A.F., Rodrigues, J.G.M. & Nascimento, F.R.F. (2023). Immunological mechanisms

involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *Parasitology*. 150(5): 401–415. <http://doi.org/10.1017/S0031182023000021>

Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H.A. & Liu, G. (2021). Cytokines: from clinical significance to quantification. *Advanced Science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany). 8(15): e2004433 <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>

Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2: 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*. 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Maguire, E., Connor-Robson, N., Shaw, B., O'Donoghue, R., Stöberl, N. & Hall-Roberts, H. (2022). Assaying microglia functions in vitro. *Cells*. 11(21): 3414. <https://doi.org/10.3390/cells11213414>

Malaguarnera L. (2019). Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients*. 11(5): 946. <https://doi.org/10.3390/un11050946>

Manríquez-Núñez, J., Mora, O., Villarroja, F., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I. F. & Ramos-Gómez, M. (2023). Macrophage activity under hyperglycemia: a study of the effect of resveratrol and 3H-1,2-dithiole-3-thione on potential polarization. *Molecules*. 28(16): 5998. <https://doi.org/10.3390/molecules28165998>

Martínez, M.C. & Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11(3): 669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>

Mase, A., Augsburger, J. & Brückner, K. (2021). Macrophages and their organ locations shape each other in development and homeostasis - a drosophila perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9: 630272. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.630272>

Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L. & He, J. (2021). Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. *Molecules*. 26(1): 229. <https://doi.org/10.3390/molecules26010229>

Meng, X., Zhou, J., Zhao, C.N., Gan, R.Y. & Li, H.B. (2020). Health benefits and molecular mechanisms of resveratrol: A narrative review. *Foods*. 9(3): 340. <https://doi.org/10.3390/foods9030340>

Moura de Gouveia, N., Ramos, S., Martín, M.Á., Espindola, F.S., Goya, L. & Palomino, O. M. (2017). *Vochysia rufa* stem bark extract protects endothelial cells against high glucose damage. *Medicines*. 4(1): 9. <https://doi.org/10.3390/medicines4010009>

Mussbacher, M., Derler, M., Basílio, J. & Schmid, J.A. (2023). NF-κB in monocytes and macrophages - an inflammatory master regulator in multitasking immune cells. *Frontiers in Immunology*. 14: 113466. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1134661>

Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A.J., Gojobori, T. & Isenovic, E.R. (2021). Leptin and obesity: role and clinical implication. *Frontiers in Endocrinology*. 12: 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>

Okouchi, M., Okayama, N., Alexander, J. S. & Aw, T. Y. (2006). NRF2-dependent glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit expression mediates insulin protection against hyperglycemia- induced brain endothelial cell apoptosis.

Current Neurovascular Research. 3(4): 249–261.
<https://doi.org/10.2174/156720206778792876>

Owen, J.B. & Butterfield, D.A. (2010). Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods In Molecular Biology*. 648: 269–277.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_18

Palmieri, E.M., McGinity, C., Wink, D.A. & McVicar, D.W. (2020). Nitric oxide in macrophage immunometabolism: hiding in plain sight. *Metabolites*. 10(11): 429.
<https://doi.org/10.3390/metabo10110429>

Park, S.J., Jeong, J.M., Jeong, H.S., Park, J.S. & Kim, N.H. (2011). Effects of epigallocatechin-3-gallate on the expression of TGF- β 1, PKC α/β II, and NF- κ B in high-glucose-stimulated glomerular epithelial cells. *Chonnam Medical Journal*. 47(2): 116–121. <https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.2.116>

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 Immunology*. 19(1): 24.
<https://doi.org/10.1186/s12865-018-0261-0>

Pérez-Pérez, A., Sánchez-Jiménez, F., Vilariño-García, T. & Sánchez-Margalet, V. (2020). Role of leptin in inflammation and vice versa. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(16): 5887. <https://doi.org/10.3390/ijms21165887>

Plauth, A., Geikowski, A., Cichon, S., Wowro, S. J., Liedgens, L., Rousseau, M., Weidner, C., Fuhr, L., Kliem, M., Jenkins, G., Lotito, S., Wainwright, L. J. & Sauer, S. (2016). Hormetic shifting of redox environment by pro-oxidative resveratrol protects cells against stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 99: 608–622.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.006>

Püschel, G.P., Klauder, J. & Henkel, J. (2022). Macrophages, low-grade inflammation, insulin resistance and hyperinsulinemia: a mutual ambiguous

relationship in the development of metabolic diseases. *Journal of Clinical Medicine*. 11(15): 4358. <https://doi.org/10.3390/jcm11154358>

Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D.M., Sevastyanova, T., Harmsen, M.C. & Kzhyshkowska, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*. 224(2): 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.11.010>

Roe, K. (2020). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*. 93(2): e12970. <https://doi.org/10.1111/sji.12970>

Ross, E.A., Devitt, A. & Johnson, J.R. (2021). Macrophages: the good, the bad, and the gluttony. *Frontiers in Immunology*. 12: 708186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>.

Russo, S., Kwiatkowski, M., Govorukhina, N., Bischoff, R. & Melgert, B.N. (2021). Meta-inflammation and metabolic reprogramming of macrophages in diabetes and obesity: the importance of metabolites. *Frontiers in Immunology*. 12: 746151. doi: 10.3389/fimmu.2021.746151.

Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J. & Struyf, S. (2018). Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions. *Frontiers in Immunology*. 9: 19–30. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01930>

Ryyti, R., Hämäläinen, M., Leppänen, T., Peltola, R. & Moilanen, E. (2022). Phenolic compounds known to be present in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) enhance macrophage polarization towards the anti-inflammatory M2 phenotype. *Biomedicines*. 10(12): 30–45. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123045>

Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E. & Saso, L. (2020). An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*. 25(22): 54–74. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>

Sameer, A.S. & Nissar, S. (2021). Toll-Like receptors (TLRs): structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility. *BioMed Research International*. 2021: 1157023. <https://doi.org/10.1155/2021/1157023>

Santa, K. (2023). Macrophages: phagocytosis, antigen presentation, and activation of immunity. En Shamsadin Athari, S. & Mehrabi Nasab, E. (Eds.), *Phagocytosis - Main Key of Immune System*. 19: 17–27. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110832>

Sekhar, R.V., McKay, S.V., Patel, S.G., Guthikonda, A.P., Reddy, V.T., Balasubramanyam, A. & Jahoor, F. (2011). Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care*. 34(1): 162–167. <https://doi.org/10.2337/dc10-1006>

Shaito, A., Posadino, A.M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W.M., Eid, A.H., Nasrallah, G.K. & Pintus, G. (2020). Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(6): 2084. <https://doi.org/10.3390/ijms21062084>

Sousa, E.S.A., Queiroz, L.A.D., Guimarães, J.P.T., Pantoja, K.C., Barros, R.S., Epiphanyo, S. & Martins, J.O. (2023). The influence of high glucose conditions on macrophages and its effect on the autophagy pathway. *Frontiers in Immunology*. 14: 1130662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1130662>

Sun, J.X., Xu, X. H. & Jin, L. (2022). Effects of metabolism on macrophage polarization under different disease backgrounds. *Frontiers in Immunology*. 13: 880286. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880286>

Suriyaprom, S., Srisai, P., Intachaisri, V., Kaewkod, T., Pekkoh, J., Desvaux, M. & Tragoolpua, Y. (2023). Antioxidant and anti-inflammatory activity on LPS-

stimulated RAW 264.7 macrophage cells of white mulberry (*Morus alba* L.) leaf extracts. *Molecules*. 28(11): 4395. <https://doi.org/10.3390/molecules28114395>

Suzuki, T., Yamashita, S., Hattori, K., Matsuda, N. & Hattori, Y. (2021). Impact of a long-term high-glucose environment on pro-inflammatory responses in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 394(10): 2129-2139. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02137-8>

Torres Castro, I., Arroyo Camarena, Ú.D., Martínez-Reyes, C.P., Gómez Arauz, A.Y., Dueñas Andrade, Y., Hernández Ruiz, J., Béjar, Y.L., Zaga Clavellina, V., Morales Montor, J., Terrazas, L.I., Kzhyshkowska, J., & Escobedo, G. (2016). Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. *Immunology Letters*. 176: 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.06.001>

Trepiana, J., Krisa, S., Renouf, E. & Portillo, M.P. (2020). Resveratrol metabolites are able to reduce steatosis in cultured hepatocytes. *Pharmaceuticals*. 13(10): 285. <https://doi.org/10.3390/ph13100285>

Farkhondeh, T., Folgado, S.L., Pourbagher-Shahri, A.M., Ashrafizadeh, M. & Samarghandian, S. (2020). The therapeutic effect of resveratrol: focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedicine & Pharmacotherapie)*. 127: 110–234. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110234>

Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*. 33(3): 127–148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>

Ulrich, K., & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 140: 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T. & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Frontiers in immunology*. 10: 1462. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>

Wang, L., Li, H., Tang, Y. & Yao, P. (2021). Potential mechanisms and effects of efferocytosis in atherosclerosis. *Frontiers in Endocrinology*. 11: 585285. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.585285>

Wang, L.X., Zhang, S.X., Wu, H.J., Rong, X.L. & Guo, J. (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 106(2): 345–358. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>

Wang, Y., Liu, Q., Kang, S.G., Huang, K. & Tong, T. (2021). Dietary bioactive ingredients modulating the cAMP signaling in diabetes treatment. *Nutrients*. 13(9): 30–38. <https://doi.org/10.3390/nu13093038>

Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B. & Kong, L. (2019). M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International Immunopharmacology*. 70: 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.050>

Wen, Y., Lambrecht, J., Ju, C. & Tacke, F. (2020). Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cellular & Molecular Immunology*. 18(1): 45–56. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8>

Wong, A., Sun, Q., Latif, I.I. & Karwi, Q.G. (2024). Metabolic flux in macrophages in obesity and type-2 diabetes. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 27: 13210. <https://doi.org/10.3389/jpps.2024.13210>

Yan, L.J. (2014). Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *Journal of Diabetes Research*. 2014: 137919. <https://doi.org/10.1155/2014/137919>

Yao, J., Wu, D. & Qiu, Y. (2022). Adipose tissue macrophage in obesity-associated metabolic diseases. *Frontiers in Immunology*. 13: 977485. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.977485>

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). *Biomedicine & Pharmacotherapie* .117:109110. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109110.

Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H. & Hu, H. (2020). Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: Mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 5(1): 209. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>

Yu, T., Gao, M., Yang, P., Liu, D., Wang, D., Song, F., Zhang, X. & Liu, Y. (2019). Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR- γ signaling during diabetic wound healing. *Journal of Cellular Physiology*. 234(4): 4217–4231. <https://doi.org/10.1002/jcp.27185>

Zhang, Q.Y., Zhang, H.Y., Feng, S.G., Yao, M.D., Ding, J.J., Li, X. M., Ye, R., Liu, Q., Yao, J., & Yan, B. (2025). Macrophage metabolic reprogramming ameliorates diabetes-induced microvascular dysfunction. *Redox Biology*. 79: 103449. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103449>

Zhu, L., Zhao, Q., Yang, T., Ding, W. & Zhao, Y. (2015). Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *International Reviews of Immunology*. 34(1): 82–100. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.969421>

IX. ANEXOS

9.1 Condiciones de cultivo de las RAW 264.7

Macrófagos de ratón: línea celular RAW 264.7.

Medio: Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, USA) y 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Sigma, Merck KgaA, DEU).

Atmósfera: 5 % CO₂ – 95 % O₂.

Temperatura: 37 °C.

9.2 Cambio de medio para cultivo adherente

De acuerdo al protocolo del Laboratorio de Estrés oxidativo y salud de la Facultad de Química, este procedimiento se realiza cada 48 h para el adecuado desarrollo del cultivo celular y su objetivo consiste en suplementar el medio con nuevos nutrientes; además, de esta manera evitamos el depósito de productos de deshecho metabólico potencialmente tóxicos y células muertas.

Para lo anterior se revisa el estado de las células al microscopio previo a cualquier procedimiento para verificar el estado del cultivo. En la campana de bioseguridad, con una pipeta estéril de 10 mL se aspira el medio y con otra pipeta estéril se depositan 5 mL de PBS 1X estéril a 37 °C. Posteriormente el cultivo se agita suavemente durante aproximadamente 10 segundos y se procede a retirar el PBS, finalmente se añaden 10 mL de medio DMEM fresco estéril previamente calentado a 37 °C.

9.3 Cosecha para transferencia y procedimientos experimentales

Para los cultivos celulares durante los periodos de incubación las células se duplican y van saturando la superficie de la caja Petri impidiendo la adherencia de las nuevas células y la adecuada distribución de los nutrientes. Por lo que, para asegurarnos de mantener el cultivo en buen estado, este debe transferirse periódicamente de acuerdo a la confluencia observada cuando se revise al microscopio.

Para la cosecha se añade tripsina-EDTA al 0.05 % (1 X; Sigma, Merck KgaA, DEU) estéril para posteriormente incubar durante 8 min a 37 °C. La tripsina es una enzima proteolítica cuya función es hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas, lo que nos ayuda a desprenderlas de la superficie en la que están adheridas y a separarlas entre sí; mientras que, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un agente quelante que se une al magnesio y al calcio, necesarios para que las integrinas mantengan la adhesión celular, de esta manera la tripsina puede acceder más fácilmente a los enlaces peptídicos para hidrolizarlos y promover el desprendimiento del cultivo. Posteriormente a la incubación con tripsina se agrega medio DMEM a 37 °C para neutralizarla, se procede a tomar una alícuota de 10 µL de las células resuspendidas y se depositan en un tubo Corning de 50 mL estéril para proceder a realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer. Finalmente se calcula el número de células que se desee sembrar y se toma una alícuota de células resuspendidas de acuerdo al dato obtenido para sembrar en medio nuevo.

Para los diferentes ensayos se repite el procedimiento anterior y se realizan cálculos para sembrar un aproximado de 2×10^4 células por pozo en una placa de 96. El mantenimiento y las transferencias se realizaron con base en los protocolos de la ATCC incluyendo modificaciones previamente establecidas en el Laboratorio de Estrés oxidativo y salud de la Facultad de Química.