



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SOBRE LA
DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL INDUCIDA POR EL
RESVERATROL EN HEPATOCITOS DE RATÓN”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

L.N. Lillian Camacho Torres

Dirigida por:

Dra. Minera Ramos Gómez

Santiago de Querétaro, Querétaro, diciembre 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SOBRE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL
INDUCIDA POR EL RESVERATROL EN HEPATOCITOS DE RATÓN

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

L.N. Lillian Camacho Torres

Dirigido por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

SINODALES

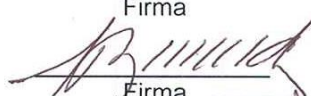
Dra. Minerva Ramos Gómez
Presidente


Firma

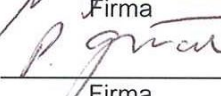
Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez
Secretario

Firma

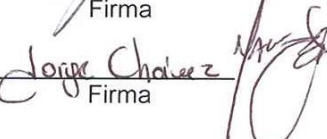
Dr. Jorge Luis Rosado Loría
Vocal


Firma

Dr. Pablo García Solís
Suplente


Firma

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Suplente

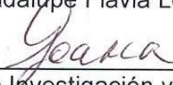

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca



Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña



Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2017
México

RESUMEN

El resveratrol es un polifenol catalogado como fitoalexina, que se produce de forma natural y en respuesta a factores bióticos y abióticos. Las plantas producen resveratrol con el propósito de disminuir la viabilidad celular de los organismos patogénicos, probablemente a través de la inhibición de la cadena transportadora de electrones (CTE) y de la F_1F_0 -ATPasa (a lo que se denomina en conjunto fosforilación oxidativa), generando un descenso de síntesis de energía, causando a su vez una disfunción mitocondrial. Por otra parte, el interés por el resveratrol ha aumentado en los últimos años debido a los efectos benéficos a la salud mostrados por este estilbeno. Sin embargo, dichos efectos benéficos se han observado únicamente en concentraciones elevadas de glucosa o lípidos, sin considerar aquellos efectos con un consumo adecuado o bajo en los cuales se podría anular el efecto benéfico e incluso mostrar efectos tóxicos. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar si la cantidad de glucosa influye en los efectos del resveratrol sobre la disfunción mitocondrial en hepatocitos de ratón (Hepa1c1c7). Las células Hepa1c1c7 se suplementaron con resveratrol en un intervalo de concentraciones (0.1 a 1000 μ M) y con concentraciones de glucosa (0.5 a 30 mM). Se empleó el ensayo MTT para determinar viabilidad celular, observándose que la concentración alta de resveratrol (1000 μ M) disminuyó en un 91% la viabilidad celular en concentraciones bajas de glucosa (0.5 a 1 mM); mientras que, a la concentración normal de glucosa (5 mM) disminuyó la viabilidad celular en un 63%, respecto a las células control. Por otro lado, concentraciones altas de glucosa (20 y 30 mM) a los diferentes intervalos de resveratrol no disminuyeron la viabilidad celular. Esto indica que existe una relación dependiente del resveratrol con el estado energético de la célula. Posteriormente, se determinó la disfunción mitocondrial por medio de potencial de membrana, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la relación ADP/ATP, los resultados demuestran que el resveratrol altera la función mitocondrial incrementando la producción de ERO, así como el potencial de membrana en condiciones de restricción energética. Por lo tanto, la relación ADP/ATP en restricción energética se incrementa en suplementación mayor a 100 μ M de resveratrol, conduciendo a un desequilibrio energético. Los resultados derivados del proyecto permitieron identificar que los efectos tóxicos del resveratrol son dependientes de la concentración de energía celular y están vinculados a la fosforilación oxidativa.

(Palabras clave: resveratrol, disfunción mitocondrial, estado energético)

SUMMARY

Resveratrol is a polyphenol classified as phytoalexin, which occurs naturally and in response to a mechanical injury or to biotic and abiotic factors. Resveratrol has been shown to reduce cell viability of pathogenic organisms, probably through inhibition of the electron transport chain (ETC) and F1F0-ATPase (which is referred to as oxidative phosphorylation in general), generating a decreased synthesis of energy, causing in turn a mitochondrial dysfunction. Interest in resveratrol has increased in recent years due to the beneficial health effects shown by this stilbene. However, such beneficial effects have been observed only at high concentrations of glucose or lipids, without considering those with adequate or low consumption in which the beneficial effect could be neglected and even show toxic effects. Therefore, the objective of the investigation was to determine whether the amount of glucose modulates the effects of resveratrol on mitochondrial dysfunction in mouse hepatocytes (Hepa1c1c7). Hepa1c1c7 cells were supplemented with resveratrol in a range of concentrations (0.1 to 1000 μ M) and with glucose concentrations (0.5 to 30 mM). The MTT assay was used to determine cell viability, and the high concentration of resveratrol (1000 μ M) was significantly decreased to 91% cell viability at low glucose concentrations (0.5 to 1 mM); while normal glucose concentration (5 mM) decreased cell viability by 63%, relative to control cells. On the other hand, high glucose concentrations (20 and 30 mM) at different resveratrol intervals did not decrease cell viability. This indicates that there is a resveratrol-dependent relationship with the energetic state of the cell. Subsequently, mitochondrial dysfunction was determined by means of membrane potential, reactive oxygen species (ROS) production and ADP/ATP ratio and the results showed that resveratrol alters mitochondrial function by increasing ROS production, as well as the membrane potential under conditions of energy restriction. Therefore, the ADP/ATP ratio is found in the energy that increases in supplementation greater than 100 μ M resveratrol, leading to an energy imbalance. The results derived from the project allowed to identify that the toxic effects of the resveratrol are dependent of the energy concentration and are linked to the oxidative phosphorylation. (Keywords: resveratrol, mitochondrial dysfunction, energetic state)

AGRADECIMIENTOS

Empecé esta etapa de mi vida lejos de las personas que siguen creyendo en mí, pensé que el camino sería difícil; sin embargo, mis ansias por aprender me llevaron a conocer a personas asombrosas. El tiempo ha pasado, he aprendido, he sufrido: ¡por que no crecen células! Y me la he pasado extraordinario. Así que, quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado porque han hecho esta aventura más fácil y dichosa.

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios.

Quiero agradecer infinitamente a mi directora de tesis, Dra. Minerva Ramos Gómez, por darme un lugar en su grupo de trabajo y sobre todo por la confianza depositada en mí. Me dio la oportunidad de conocer y trabajar en algo que había añorado desde hace mucho tiempo, así que, es parte de un sueño más logrado, de darme la libertad de trabajar en sus instalaciones, de apoyarme en aquellos momentos de crisis, donde pensaba que tal vez esto, no era para mí, sus conversaciones en clases de seminario me motivaron muchas veces a seguir por este camino. Así que la respeto y la admiro, muchas gracias.

A los integrantes de mi comité, por sus aportaciones para la realización del proyecto y la mejora constante de mi formación académica y personal.

A mi compañero de cuarto de cultivo: Josué, me enseñaste todo lo que se debe y no se debe de hacer en un laboratorio, lo que pensé que sería imposible de aprender, pero aprendí. Eres un buen maestro y amigo. Así que gracias, porque tú también fuiste parte de mis crisis existenciales y mis temblorosas manos cambiando medios y me alentaste a seguir adelante, siempre me diste tu apoyo y paciencia y eso es algo que valoro. Sé que llegarás muy lejos.

Agradezco profundamente al Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez, ya que con su asesoría y confianza fue posible la realización de este proyecto, del cual me enamore, gracias por los buenos momentos, la risa, la buena música y la amistad otorgada este tiempo. Gracias por brindarme parte de tu tiempo para enseñarme y siempre estar con la mejor disposición y actitud. Te respeto y te admiro, porque el optimismo hace la vida más fácil.

A mis compañeras de laboratorio, muchas gracias: Diana, sé que las células van a extrañar nuestras conversaciones en ese cuarto de cultivo, lo que pasa en el cuarto de cultivo, se queda en el cuarto de cultivo; Adri (Martínez y colaboradores) también por contagiarme de alegría en momentos de estrés; a la siempre complicada, pero peculiar “Gpe”, amo tus historias; America, porque creo que me salve de tus regañones!?!; Itzel, por ser transparente y sin complicaciones; Delia, por contagiar de risa con tantos memes, siempre hay un buen meme para un buen momento; Beto (no doctor, aunque algún día jajajaja) por compartir buenas historias, ofertas de

cualquier tipo, incluso doctorados y por intentar corromperme con antojos, algunas veces lo lograste otras tantas no hubo éxito. Les agradezco los buenos momentos de risa y bullying colectivo. Todos son maravillosas personas y me llevo lo mejor de cada uno de ustedes.

Gracias a mi familia, por siempre creer en mí, comprenderme, por nunca juzgar mis decisiones y alentarme con su amor y paciencia a seguir cada uno de mis sueños. Ustedes saben que, sin su apoyo incondicional, este camino hubiera sido muy difícil. Especialmente a mi mamá, que nunca ha dejado de creer en mí y que se ha sumado a mis aspiraciones no solo intelectuales, sino también recreativas y de aventura, sabes lo que significas para mí, la mejor compañía, guía, simplemente la mejor. A mi hermana Caro, me has sorprendido con tu tenacidad y entrega, creo que tú eres la mayor (jajajaja), eres un ejemplo de que se puede ser mamá y profesionista al mismo tiempo y gracias por brindarme la oportunidad de ser tía del “enfermero” más cool y simpático. A mí siempre complicada, pero increíblemente optimista hermana Paola, tus aventuras me han salvado de colapsos mentales y finalmente a mi único y especial hermano Dani, sé que cada abrazo que me das dice más de lo que podrías decirme, sigue adelante, se imparabile, siempre fiel a tus principios, sabes que estoy para ti. Los amo infinitamente.

No puedo dejar de agradecer a una persona, que fue parte del inicio de esta aventura, gracias por tu compañía, comprensión y apoyo en mis momentos de meditación, estudio, lectura y escritura de esta tesis. Y gracias a mis siempre fieles mosqueteros (Alain y Vianey), porque aún a la distancia contribuyeron con este sueño.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
2.1. Producción de fitoalexinas en plantas	10
2.2. Resveratrol	11
2.2.1. Efectos biológicos del resveratrol	13
2.2.2. Resveratrol y su asociación con función mitocondrial	14
2.2.3. Mecanismos moleculares de acción del resveratrol en la mitocondria .	14
2.3. Cadena transportadora de electrones	16
2.4. Mitocondria y mecanismos de glucosa elevada	17
2.5. Mitocondria como generador de especies reactivas de oxígeno (ERO)	18
2.6. Activación de proteínas cinasas (AMPK)	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Materiales	23
6.1.1 Línea celular y medio de cultivo	23
6.1.2 Modelo de estudio: Hepatocitos	23
6.1.3 Material químico	24
6.2 Métodos	24
6.2.1 Cultivo celular	24
6.2.2 Suplementación con resveratrol y glucosa	24
6.2.3 Viabilidad celular por medio de ensayo de MTT	25

6.2.4. Cuantificación de proteína total BCA	26
6.3 Disfunción mitocondrial	27
6.3.1 Determinación de la liberación peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) por medio de Amplex Red	27
6.3.2 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	27
6.3.3 Relación ADP/ATP.....	28
6.4 Análisis estadístico	28
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
VII.1. Viabilidad celular y cuantificación de proteína por BCA (ácido bicinónico)	29
VII.2. Liberación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	36
VII.3. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	41
VII.4 Relación ADP / ATP	44
VIII. CONCLUSIONES	48
IX. BIBLIOGRAFÍA	50
X. ANEXOS	60
Anexo 1. Condiciones de cultivo de hepatocitos de ratón.....	60
Anexo 2. Viabilidad celular por medio de ensayo de MTT	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química <i>cis</i> y <i>trans</i> del resveratrol.....	12
Figura 2. Condiciones experimentales del ensayo MTT.....	26
Figura 3. Efecto diferencial de la glucosa sobre la viabilidad en células	30
Figura 4. Efecto del resveratrol en concentraciones altas de glucosa.....	32
Figura 5. Efecto del resveratrol sobre viabilidad celular y cuantificación de proteína total en concentración estándar de glucosa	33
Figura 6. Efecto del resveratrol bajo condiciones de restricción energética sobre viabilidad y cuantificación de proteína total	34
Figura 7. Efecto de la concentración 1000 μ M de resveratrol sobre la viabilidad celular y la concentración total de proteína total	35
Figura 8. Efecto del resveratrol sobre la liberación de H ₂ O ₂ en concentración estándar de glucosa	36
Figura 9. Efecto del resveratrol sobre la liberación de H ₂ O ₂ en concentraciones elevadas de glucosa.....	39
Figura 10. Efecto del resveratrol en restricción energética sobre la cuantificación de H ₂ O ₂ liberado.....	40
Figura 11. Efecto del resveratrol sobre el potencial de membrana mitocondrial en concentraciones elevadas de glucosa.....	42
Figura 12. Efecto del resveratrol sobre el potencial de membrana mitocondrial en concentración estándar de glucosa.....	43
Figura 13. Efecto del resveratrol sobre el potencial de membrana mitocondrial en restricción energética	44
Figura 14. Efecto del resveratrol sobre la relación ADP/ATP en concentraciones elevadas de glucosa.....	45
Figura 15. Efecto del resveratrol sobre la relación ADP/ATP determinado bajo condiciones estándar de glucosa	46
Figura 16. Efecto del resveratrol la relación ADP/ATP en restricción energética..	47

I. INTRODUCCIÓN

El resveratrol (3,4,5 trihidroxi-*trans*-estilbeno) es un polifenol compuesto de dos anillos benzoicos unidos entre sí por un doble enlace tipo estilbeno, que actúa como una fitoalexina y se produce en respuesta al reto a factores bióticos y abióticos en las plantas. En este sentido, la síntesis del resveratrol se ha relacionado principalmente como un mecanismo de defensa contra el ataque por hongos patógenos en las plantas que lo producen (Jeandet *et al.*, 2014), sugiriendo la toxicidad de esta molécula. Sin embargo, aún no se conoce con certeza el mecanismo de acción molecular (Ahuja *et al.*, 2012).

La estructura química del resveratrol presenta grupos hidroxilo, que le permiten asociarse a los ácidos grasos favoreciendo la unión a biomembranas. La inhibición causada por el resveratrol sobre proteínas que se encuentran asociadas a la membrana como los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (CTE) y la F₁F₀-ATPasa, que en conjunto llevan a cabo la fosforilación oxidativa, sugiere que el sitio de acción de este polifenol son las biomembranas de la mitocondria. Además, el efecto negativo del resveratrol sobre la mitocondria corrobora que el mecanismo de toxicidad del resveratrol se debe a la inhibición de la fosforilación oxidativa (Madrigal-Perez *et al.*, 2016). Por lo tanto, es de esperar que el resveratrol sea una molécula prooxidante al afectar la producción de energía y ocasionar una disfunción mitocondrial (Hardie, 2008) que pudiera estar relacionada con el estado energético (Baur *et al.*, 2006), lo que resultó crucial para realizar esta investigación.

II. ANTECEDENTES

Se ha detallado de forma extensa que las plantas producen sustancias anti fúngicas en respuesta al ataque de hongos patógenos (Bernard y *et al.*,1911); en los tubérculos de dos especies de orquídeas, *Ochis morio* y *Loroglossum hircinum*, se ha observado que adquieren resistencia a nuevos ataques de hongos después de ser infectados con *Rhizoctomia repens* (Soessl y Arditti, 1984). Este mismo fenómeno se descubrió en tubérculos de papa infectados por *Phytophthora infestants* y llamaron a estas sustancias fitoalexinas, las cuales son compuestos químicos producidos en respuesta a la invasión de las células vivas por un parásito (Muller y Burger, 1940). Este concepto ha sido modificado por fenómenos importantes que ocurren en la planta infectada: el primero es la producción de toxinas en las células de la planta afectadas por la infección y el segundo es la adquisición de resistencia de la planta después de la exposición con microorganismos (Grayer y Kokubun, 2001). Por lo tanto, esta definición se ha ido modificando frecuentemente; ya que las fitoalexinas no solo se producen por el ataque de hongos, sino también por factores de estrés no biológicos tales como irradiación UV o el tratamiento con metales pesados como cobre o sales de mercurio (Mithofer *et al.*, 2004).

El término fitoalexina se limita generalmente a metabolitos secundarios de bajo peso molecular, habitualmente por debajo de 1000 moles, de modo que no se aplica a péptidos antifúngicos y proteínas producidas por las plantas. Por lo tanto, se define por la dinámica de la biosíntesis y las funciones, no por su estructura química o la ruta biosintética a través de la cual se formaron (Grayer y Kokubun, 2001), tal es el caso del resveratrol.

El resveratrol (3, 4', 5-trihidroxi-*trans*-estilbeno) fue aislado por primera vez de las raíces blancas de *Veratrum grandiflorum* (Takaoka, 1940); más tarde en 1963, se aisló de las raíces de *Polygonum cuspidatum*, una planta utilizada en la medicina tradicional china y japonesa (Nonomura *et al.*, 1963) como tratamiento en inflamación, infecciones, enfermedades de la piel, hiperlipidemia y cáncer (Peng *et al.*, 2013). Así mismo, el resveratrol ha estado vigente desde la época antigua en

preparaciones medicinales, como en los géneros *Darakchasava* o *Manakka* (Paul *et al.*, 1999) como tratamiento de diversas enfermedades. Por ello, el resveratrol al considerarse un polifenol con efectos benéficos a la salud, pero tóxico para hongos, resulta relevante indagar sobre su producción en plantas y efecto molecular en células a fin de conocer el mecanismo molecular a través del cual el resveratrol ejerce una amplia gama de efectos benéficos, que aún no está del todo claro.

2.1. Producción de fitoalexinas en plantas

Las plantas están expuestas a diferentes condiciones ambientales, que incluyen una combinación de factores bióticos (microorganismos) y abióticos (rayos UV), o daños mecánicos (heridas de insectos), los cuales generan sustancias tóxicas en la planta, no solo como mecanismo de defensa sino también para beneficio propio (Atkinson y Urwin, 2012). Dichos factores provocan una respuesta celular y molecular compleja implementada por la planta con el fin de evitar daños y asegurar su supervivencia. Dentro de los compuestos inducidos por el estrés biótico que permiten la defensa de la planta hacia patógenos se encuentran las fitoalexinas que son sustancias tóxicas para los microorganismos (Dey *et al.*, 1991).

Aunque los mecanismos por los cuales las fitoalexinas ejercen su toxicidad aún se desconoce, se ha propuesto el daño de las membranas microbianas y la inducción de muerte celular programada como mecanismos de acción de las fitoalexinas (Ahuja *et al.*, 2012). Por lo tanto, las fitoalexinas tienen una participación importante en el sistema de defensa de las plantas contra organismos patógenos. La naturaleza de la interacción entre las plantas y los organismos patógenos depende en gran medida por la capacidad de este último para metabolizar las fitoalexinas (Wu y VanEtten, 2004), las cuales se sintetizan en células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes como susceptibles, es decir, se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar de infección (Grayer y Kokubun, 2001). Después de una infección, las fitoalexinas son sintetizadas rápidamente, casi horas después del ataque del organismo patógeno,

y son tóxicas para un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas (Taiz y Zeiger, 2003); tal efecto tóxico se ha relacionado con una alteración del metabolismo energético en los hongos.

Por ello, esto es crucial para comprender los efectos biológicos del resveratrol en eucariotas superiores; así como establecer la importancia biológica en las plantas; esto ayudará a entender y discriminar con mayor detalle los efectos moleculares detrás del fenotipo asociado con el resveratrol (Madrigal-Perez *et al.*, 2015).

2.2. Resveratrol

El resveratrol es una fitoalexina, catalogado como un polifenol, que se produce de forma natural en respuesta a la lesión mecánica, ataque de organismos patógenos o exposición a radiación UV (Burns *et al.*, 2002). Por ejemplo, en el fruto de la vid, la uva la concentración de resveratrol es muy variable y depende de la especie de uva, el clima y la presión fúngica, siendo mayor en la piel del fruto y en las semillas. El resveratrol se extrae usualmente de las uvas rojas y se ha estimado que en el epicarpio de las uvas se encuentra en una concentración de 50 a 100 µg/g.

Su estructura básica se compone de dos anillos benzoicos unidos entre sí por un doble enlace de estilbeno, que forma 3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno con un peso molecular de 228.25 g/mol. Este doble enlace es responsable de los isómeros *cis-trans* (Figura 1) de resveratrol (Trela y Waterhouse, 1996). La forma *trans* es el que predomina en fuentes dietarias y suplementos por ser más estable.

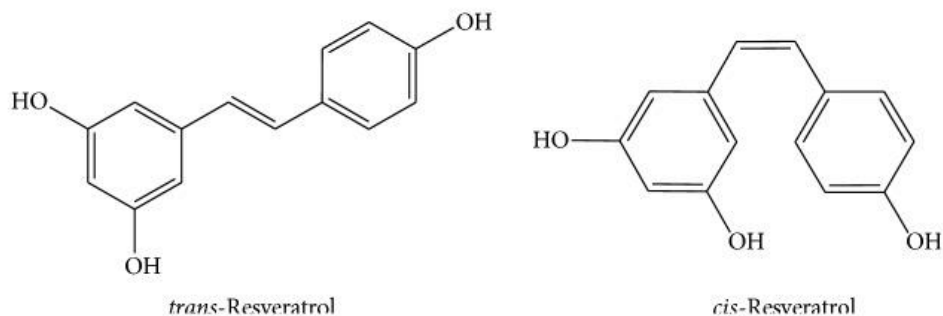


Figura 1. Estructura química *cis* y *trans* del resveratrol (Gambini *et al.*, 2015)

El resveratrol es un compuesto de usos múltiples eficaz para mejorar la salud y prevenir o tratar enfermedades crónicas. Se ha demostrado que su actividad biológica depende de sus determinantes estructurales, incluyendo el número y posición de los grupos hidroxilo, el enlace de hidrógeno intramolecular, estereoisomería y la presencia de un doble enlace (Catalgol *et al.*, 2012). De igual forma, la presencia de grupos aromáticos en su estructura, le confiere la capacidad de funcionar como antioxidante y prevenir reacciones de oxidación. Por otro lado, el resveratrol a bajas concentraciones presenta actividad prooxidante por un aumento en la producción de superóxido intracelular (Sassi *et al.*, 2014) que conlleva a la inducción de sistemas antioxidantes.

Por lo tanto, existe evidencia que indica que el resveratrol, una fitoalexina, puede estar actuando sobre las membranas mitocondriales afectando la producción de energía de los organismos patógenos (Jeandet *et al.*, 2012). Así, el mecanismo de defensa por el cual actúa el resveratrol está asociado con la inhibición de la cadena transportadora de electrones (CTE) (Xu *et al.*, 2015) y la F_1F_0 -ATPasa. No obstante, este mecanismo no se ha asociado con los efectos benéficos a la salud relacionados con el resveratrol; sin embargo, existe evidencia que indica que ambos mecanismos pueden converger a nivel molecular, lo que ayudaría a entender el efecto biológico del resveratrol asociado a sistemas biológicos (Madrigal-Perez y Ramos-Gómez, 2016).

2.2.1. Efectos biológicos del resveratrol

Cuantiosos estudios han reportado la actividad antioxidante y el efecto protector cardiovascular del resveratrol, sustancia que presenta actividad antiproliferativa, antitumoral, así como agente citotóxico en varios tipos de cáncer (Athar *et al.*, 2007). Sin embargo, dichos mecanismos aún merecen ser evaluados (Chun *et al.*, 2013), ya que hay evidencia que sugiere lo contrario; un ejemplo de ello, es el mecanismo antiapoptótico, el cual resulta incierto. Algunos estudios han sugerido que esta función podría estar mediada a través de receptores como Bax (Bcl-2-associated X protein, por sus siglas en inglés) un regulador positivo de apoptosis. La actividad antiproliferativa del resveratrol se ha demostrado en varias líneas celulares a través de la detención del ciclo celular en la fase G2 (Schenider *et al.*, 2000). Por otro lado, se demostró el efecto proapoptótico del resveratrol durante la fase G1 del ciclo celular (Liu *et al.*, 2014). Además, esta fitoalexina podría actuar a través de la disminución de la biosíntesis de poliaminas a través de la inhibición de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), enzima responsable de la producción de compuestos necesarios para la división celular (Wolter *et al.*, 2004).

El interés en el resveratrol alcanzó su punto máximo a partir de estudios donde se identificó como un activador de SIRT1 (sirtuina 1) (Howitz *et al.*, 2003) capaz de imitar los efectos de la restricción energética (Baur *et al.*, 2006), mediante el aumento de la longevidad en las levaduras (Howitz *et al.*, 2003), gusanos (Wood *et al.*, 2004), moscas (Bass *et al.*, 2007) y peces (Valenzano *et al.*, 2006). Actualmente, la participación del resveratrol y SIRT1 sobre la longevidad es aún objeto de debate, por lo cual sus efectos terapéuticos ameritan investigarse.

Recientemente, se ha detallado que un mediador clave de los efectos metabólicos del resveratrol puede ser AMPK, una proteína cinasa activada de AMP; que se activa por las condiciones que aumentan la relación AMP/ATP (Chung *et al.*, 2013), dicha activación de AMPK se incrementa por la restricción energética (Poel *et al.*, 2009). Existe evidencia que sugiere que el resveratrol disminuye los niveles de ATP intracelular y activa AMPK en una relación dependiente de ATP/AMP, pero solo se ha demostrado en altas concentraciones de resveratrol (100 a 300 μM) (Puissant *et*

al., 2010). En cuanto a la restricción energética, el ayuno estimula la liberación de glucagón y catecolaminas que se unen a sus receptores aumentando la producción de cAMP mediante la activación de adenilato ciclasas (ACS). Por ello, células expuestas a concentraciones bajas de sustratos oxidables, incrementan la fosforilación de AMPK, por un descenso en los niveles de ATP, mostrando efectos benéficos como prolongación de la vida útil.

2.2.2. Resveratrol y su asociación con función mitocondrial

La actividad antioxidante se ha determinado en mitocondrias aisladas de cerebro de rata, demostrando que el resveratrol inhibe la respiración mitocondrial a nivel del complejo III al competir con la coenzima Q por los electrones. Este hecho es relevante, ya que determina la actividad antioxidante en la mitocondria, no sólo por su capacidad de absorber electrones no pareados, sino también mediante la inhibición de un complejo que genera radicales libres (Zini *et al.*, 1999). A su vez, dentro de los efectos interesantes del resveratrol se incluye la inducción de genes importantes para la función mitocondrial como PGC-1 α (peroxisome proliferator activated co-activator 1 α , por sus siglas en inglés), un regulador maestro de la biogénesis mitocondrial (Svensson *et al.*, 2015), que conduce a un incremento en la función mitocondrial; sin embargo, dicho efecto merece ser evaluado. Por lo anterior, resulta crucial entender cuál es el mecanismo molecular que se ha asociado al resveratrol y como éste afecta la función mitocondrial.

2.2.3. Mecanismos moleculares de acción del resveratrol en la mitocondria

En diversos estudios se ha detallado la relación del resveratrol con la mitocondria, observándose en ratones de edad avanzada que el resveratrol estimula la actividad del complejo I a concentraciones bajas (<5 μ M), mientras que concentraciones elevadas (>50 μ M) disminuyen dicha actividad (Saintidrian *et al.*, 2013), generando

estrés oxidativo. Lo anterior aporta nuevas ideas sobre el mecanismo de acción del resveratrol en la mitocondria y pone en manifiesto la importancia del equilibrio entre efectos desfavorables y los antioxidantes del resveratrol en función de la dosis y la edad (Guenguen *et al.*, 2015).

En base a lo anterior se concluye que la mayoría de los estudios experimentales donde se analizan los efectos benéficos resveratrol se han evaluado en condiciones de estrés oxidativo o alteraciones metabólicas (dietas altas en grasa, diabetes e isquemia, entre otros). Sin embargo, estos efectos pueden variar dependiendo del modelo experimental empleado y las condiciones de experimentación. Por ejemplo, la administración de 1 mg/kg/día de resveratrol durante 30 días en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa mostró efectos benéficos al aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Sin embargo, dichos efectos no se observan en ratas con dieta estándar; por el contrario, se disminuyen sistemas antioxidantes, como el glutatión (GSH) (Rocha *et al.*, 2009).

En condiciones de diabetes, niveles elevados de glucosa en sangre inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de múltiples vías, dando como resultado el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la actividad del óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe), reduciendo la disponibilidad de óxido nítrico (NO) y la generación de más ERO (Porter *et al.*, 2013). Se ha demostrado un incremento en la producción intracelular de ERO en células vasculares incubadas con una concentración elevada de glucosa (30 mM) durante 30 minutos sin resveratrol. Por el contrario, un pre tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente la generación de ERO en una forma dependiente de la concentración. Dentro de la mitocondria, las enzimas NADPH oxidasas se han implicado como principal fuente de generación de ERO en respuesta a glucosa elevada (Rong *et al.*, 2014). Así mismo, es relevante entender como está relacionado el consumo elevado de glucosa sobre los probables efectos en la CTE.

2.3. Cadena transportadora de electrones

La cadena respiratoria o CTE está localizada en la membrana mitocondrial interna y su principal función es la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa. La CTE consiste en 4 complejos: Complejo I donde se transporta los electrones procedentes del NADH obtenido de la glucólisis, la β -oxidación, el ciclo de Krebs u oxidación de aminoácidos, hacia la poza de quinonas; el complejo II que transporta los electrones del FADH obtenido de la oxidación del succinato y transfiere a la coenzima Q los electrones generados de ambos complejos. Normalmente, la transferencia de electrones se realiza a través de complejos I, III y IV hacia el exterior en el espacio intermembranal, generando un transporte de protones que impulsa la ATP sintasa para la fosforilación de ADP en ATP.

El complejo I o NADH deshidrogenasa oxida NADH a NAD⁺ y transporta protones hacia el espacio intermembranal a través de la membrana interna generando un gradiente de protones (gradiente electroquímico). En el caso del complejo II o succinato deshidrogenasa actúa el FADH₂ que se forma durante la conversión de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico. Los electrones son transferidos por medio de sistemas Fe-S hacia la coenzima Q. El complejo III o citocromo c obtiene dos electrones desde QH₂ y los transfiere al citocromo c o complejo IV, el cual capta cuatro electrones de las cuatro moléculas de citocromo c y se transfieren al anión superóxido (O₂[•]) para producir dos moléculas de agua. Al mismo tiempo se translocan cuatro protones al espacio intermembranal por los cuatro electrones generados; además, desaparecen de la matriz dos protones que forman parte del agua (Nicholls y Ferguson, 2013) como un producto final de la fosforilación oxidativa junto con el ATP.

Por el contrario, en células incubadas con alta concentración intracelular de glucosa se produce un mayor nivel de piruvato derivado de la glucosa que se oxida en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), aumentando con ello el flujo de electrones donados por el NADH y FADH a la CTE (Giacco y Brownlee, 2010). Como resultado, el gradiente de la membrana mitocondrial se incrementa hasta un umbral crítico; en

este punto, la transferencia de electrones dentro del complejo III se bloquea (Trumpower, 1990), haciendo que los electrones que dona la coenzima Q regresen uno a la vez al oxígeno molecular generando O_2^{\bullet} . La isoforma mitocondrial de la enzima SOD dismuta este radical libre de oxígeno (O_2^{\bullet}) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que luego se convierte en agua y oxígeno por otras enzimas, como la CAT. Cualquier alteración de la actividad de la cadena respiratoria causa varios desórdenes afectando la producción y reciclaje de ATP, conocido como disfunción mitocondrial (Brand y Nicholls, 2011).

2.4. Mitocondria y mecanismos de glucosa elevada

La glucólisis se requiere para la producción de ATP mitocondrial, ya que proporciona las moléculas de piruvato necesarias para la actividad mitocondrial. Por lo tanto, bajo condiciones fisiológicas normales las células utilizan la fosforilación oxidativa y la glucólisis para generar energía (Rafikov *et al.*, 2015).

La glucosa elevada a nivel celular induce una toxicidad similar al estrés oxidativo, al aumentar la respiración mitocondrial; el metabolismo de la glucosa promoverá la formación excesiva de ERO que, en forma conjunta con las defensas antioxidantes insuficientes, pueden dañar las células, específicamente la mitocondria (Apel y Hirt, 2004), generando un incremento de O_2^{\bullet} mitocondrial producido por el complejo I (Murphy, 2009), que posteriormente se convertirá a otras especies reactivas (Wallace, 1992) que pueden dañar las células de diversas maneras y que se cree pudieran ser el origen de complicaciones inducidas por glucosa elevada. Aunado a esto, el resveratrol oxidado genera complejos con el cobre que fragmentan el ADN (Hadi *et al.*, 2010), dañando la mitocondria. Sin embargo, este mecanismo merece ser estudiado.

Hallazgos importantes dentro de esta área sugieren que, el resveratrol, al tener afinidad por las biomembranas, pudiera interactuar con proteínas dentro de la CTE, alterando la misma y generando un efecto prooxidante.

2.5. Mitocondria como generador de especies reactivas de oxígeno (ERO)

La mitocondria es la principal fuente celular de ERO, los cuales se derivan del metabolismo del oxígeno o de la CTE y se incluyen el $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ (radical hidroxilo) y ROO^{\bullet} (radical peróxido).

Las ERO puede inducir daño oxidativo a través de la peroxidación de lípidos de las membranas celulares (Magder, 2006). Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas normales existen sistemas antioxidantes como el GSH, las enzimas SOD y CAT, entre otras, capaces de mantener un equilibrio sobre el daño oxidativo (Droge, 2002).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que el resveratrol protege cultivos de hepatocitos primarios contra necrosis o muerte inducida por estrés oxidativo mediante el aumento de la actividad de las enzimas CAT, SOD y glutatión S-transferasa (GST), así como de los niveles de GSH y NADPH. Lo anterior como consecuencia de la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear eritroide Nrf2 (por sus siglas en inglés), promoviendo su translocación del núcleo y activando la transcripción de genes de respuesta antioxidante, entre otros (Ruibiolo, 2008).

2.6. Activación de proteínas cinasas (AMPK)

AMPK es una enzima que responde a la disminución en el estado de energía celular por procesos que generan ATP, tales como la oxidación de ácidos grasos y el transporte de glucosa (Weikel *et al.*, 2016); AMPK actúa como un sensor de baja energía celular mediante el control de la relación AMP, ADP y ATP (Hardie, 2011).

El complejo enzimático se compone de tres subunidades catalíticas α y dos subunidades reguladoras β y γ (Hardie, 2008). AMPK es activada por la fosforilación de la subunidad α en Thr 172 por la cinasa del hígado B1 (LKB1) o la proteína cinasa β dependiente de Ca^{2+} (CaMKK β) (Woods *et al.*, 2003) en respuesta al agotamiento

de los niveles de ATP, activando a su vez vías catabólicas que generan ATP/AMP para restaurar el balance de energía. Los efectos del AMP son una activación alostérica directa, ya que afecta la proporción de fosforilación de AMPK en dirección positiva, así como la desfosforilación negativa (Hardie, 2011).

AMPK desempeña un rol importante en la regulación del metabolismo hepático; durante el ayuno, la activación de AMPK restringe la síntesis de glicerolípidos a través de la disminución de la actividad de la enzima glicerol 3 fosfato aciltransferasa (Gallis *et al.*, 2012) que induce la inhibición del factor de transcripción SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding proteins, por sus siglas en inglés), el cual disminuye la expresión de genes lipogénicos (Hardie, 2015). Sin embargo, en estados de sobrealimentación la producción de glucosa hepática se aumenta; por el contrario, un mecanismo clave por el cual el resveratrol disminuye la resistencia a la insulina, es a través de la inhibición de gluconeogénesis hepática influida específicamente por la activación de AMPK (Kulkarni y Cantó, 2014). Debido a esto, el resveratrol activa AMPK en base a la capacidad que tiene de unirse e inhibir la F_1F_0 -ATPasa mitocondrial, deteriorando así la producción de ATP (Hawley *et al.*, 2010, Chung, 2012;). Por ello, resulta ser una alternativa contra diversas enfermedades y un blanco molecular importante para múltiples xenobióticos.

III. JUSTIFICACIÓN

El resveratrol es un compuesto polifenólico producido por varias especies de plantas incluyendo uvas, pistaches y nueces (Baur y Sinclair, 2006) que se produce ante situaciones de estrés de la planta, como el ataque de organismos patógenos (Jeandet *et al.*, 2002). Dicho compuesto presenta una amplia gama de propiedades benéficas para la salud, tales como potencial antioxidante (Cheng *et al.*, 2013), anti-inflamatorio (Chiou *et al.*, 2014) y adelgazante (Lephart *et al.*, 2014). En base a estas actividades biológicas, el interés por el resveratrol ha aumentado, atribuyéndole propiedades cuyo mecanismo de acción aún no ha sido elucidado (Madrigal-Perez *et al.*, 2015).

Existen estudios en los que el resveratrol actúa como un eliminador de radicales libres (Ferrero *et al.*, 1998), presenta capacidad de mejorar el gasto de energía al aumentar la respiración mitocondrial y la oxidación de lípidos (Lagouge *et al.*, 2006). Sin embargo, existe evidencia de que el resveratrol presenta actividad prooxidante bajo ciertas condiciones experimentales (Burns *et al.*, 2002) causando daño oxidativo del ADN que puede conducir a la detención del ciclo celular o a la apoptosis. Por lo tanto, dicha inhibición de la respiración mitocondrial podría ser el principal blanco molecular del resveratrol. La propia identificación y validación de las dianas celulares del resveratrol son la clave para la comprensión de sus beneficios a la salud.

La presente investigación tuvo como objetivo dilucidar el mecanismo que tiene el resveratrol en el metabolismo de la glucosa, probando el vínculo molecular que existe entre estos compuestos sobre la función mitocondrial; ya que dicho mecanismo sigue siendo desconocido. Para lo anterior, en el presente estudio se suplementaron hepatocitos (células Hepa1c1c7) a distintas concentraciones de glucosa en presencia de resveratrol para evaluar la relación que existe entre ambos con la disfunción mitocondrial.

Es importante asegurar que el uso del resveratrol se proponga como un coadyuvante efectivo contra padecimientos como cáncer por su potencial citotóxico.

Así mismo, existen pocos reportes del efecto del resveratrol en el metabolismo mitocondrial en tejidos de animales abriendo un panorama nuevo y relevante de investigación y del cual se pretende dilucidar como actúa el resveratrol en hepatocitos con diferentes concentraciones de glucosa.

IV. HIPÓTESIS

La disfunción mitocondrial ocasionada por el resveratrol es influenciada por la concentración de glucosa en los hepatocitos de ratón Hepa1c1c7.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la concentración de glucosa y su relación con los efectos del resveratrol sobre la disfunción mitocondrial en hepatocitos de ratón Hepa1c1c7

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la interacción entre resveratrol y glucosa en la viabilidad de células de hepatocitos de ratón Hepa1c1c7.
2. Determinar la disfunción mitocondrial inducida por el resveratrol y la glucosa en células de hepatocitos de ratón Hepa1c1c7.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Línea celular y medio de cultivo

La línea celular Hepa1c1c7 utilizada en este proyecto de investigación se adquirió de la *American Type Culture Collection* (ATCC), se trata de hepatocitos de ratón. Las células se mantuvieron en medio de cultivo α -MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), bicarbonato de sodio (Baker, Xalostoc, Edo. de México), suero fetal bovino (SFB) al 10% (Microlab, México) y 1% antibiótico (Sigma-Aldrich).

6.1.2 Modelo de estudio: Hepatocitos

Los hepatocitos son células propias del hígado que forman su parénquima, que constituyen el componente secretor endócrino y exócrino y constituyen el 80% del tejido hepático. Se caracterizan por tener un marcado aumento en las actividades de las enzimas glucolíticas incluyendo hexocinasas, con una disminución simultánea en la actividad de las enzimas gluconeogénicas.

Hepa1c1c7 es una línea celular que se deriva de hepatoma de ratón (*Mus musculus*). Las células presentan una morfología epitelial, tamaño de 18 micrones, segregan plasma mayormente proteico; por ejemplo, albúmina, transferrina, fibrinógeno y α -2-macroglobulina. Las células Hepa1c1c7 se cultivan satisfactoriamente en sistemas de cultivo a gran escala y tienen gran aplicación científica para vislumbrar estudios sobre el metabolismo hepático y la toxicidad de xenobióticos y la inducción a nivel transcripcional de sistemas antioxidantes.

6.1.3 Material químico

Se usó *trans*-resveratrol obtenido de Sigma-Aldrich, para suplementar las células Hepa1c1c7 en concentraciones de 0.1, 1.0, 10, 100 y 1000 μ M y dextrosa (Sigma-Aldrich) como medio de energía para las células, en un intervalo de concentraciones de 0.5 a 30 mM.

6.2 Métodos

6.2.1 Cultivo celular

Para el cuidado inicial de las células Hepa1c1c7 se siguieron las recomendaciones de ATCC, posteriormente se mantuvieron en medio mínimo (α -MEM, Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (Sigma-Aldrich), y 1% antibiótico (Sigma-Aldrich); el medio se descartó cada 2 a 3 días, (anexo 1).

Se mantuvieron en frascos con 10 ml del medio de cultivo en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se transfirieron incubando con 0.25% tripsina-EDTA (1x) y amortiguador fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se añadieron 7 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina; la mezcla resultante se añadió en el frasco nuevo y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Para los experimentos se mantuvieron las células Hepa1c1c7 en placas de 96 pozos, después se trataron con las diferentes concentraciones de glucosa y resveratrol en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ por 24 h.

6.2.2 Suplementación con resveratrol y glucosa

Las diferentes concentraciones de resveratrol se diluyeron a partir de una solución inicial de trabajo 50 mM, el cual se disolvió en 1 ml de DMSO al 0.25% para no afectar la viabilidad celular. Las suplementaciones utilizadas de resveratrol fueron 0.1, 1, 10, 100 y 1000 μ M. Las concentraciones de glucosa se diluyeron a partir de una solución inicial de trabajo de 800 mM, la cual se disolvió en 5 ml de medio

(DMEM) sin glucosa, hasta obtener las concentraciones seleccionadas de glucosa (0.5, 1, 5, 10, 20 y 30 mM).

6.2.3 Viabilidad celular por medio de ensayo de MTT

Se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa (0.5 y 1 mM) para restricción energética), 5 mM (concentración estándar) y 10, 20 y 30 mM (concentración elevada) y las diferentes suplementaciones de resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μ M) a fin de identificar la concentración que pudiera presentar citotoxicidad para la línea celular antes descrita (Figura 2). La prueba de citotoxicidad se realizó mediante ensayo con bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT), basado en la reducción metabólica del reactivo realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que genera un compuesto de color azul oscuro llamado formazán, lo que permitió determinar la funcionalidad y la actividad metabólica mitocondrial de las células suplementadas; la cantidad de células activas fue proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983) (anexo 2). Finalmente, se calculó la viabilidad celular en función de los valores de la absorbancia, cuyos valores se expresaron en porcentajes.

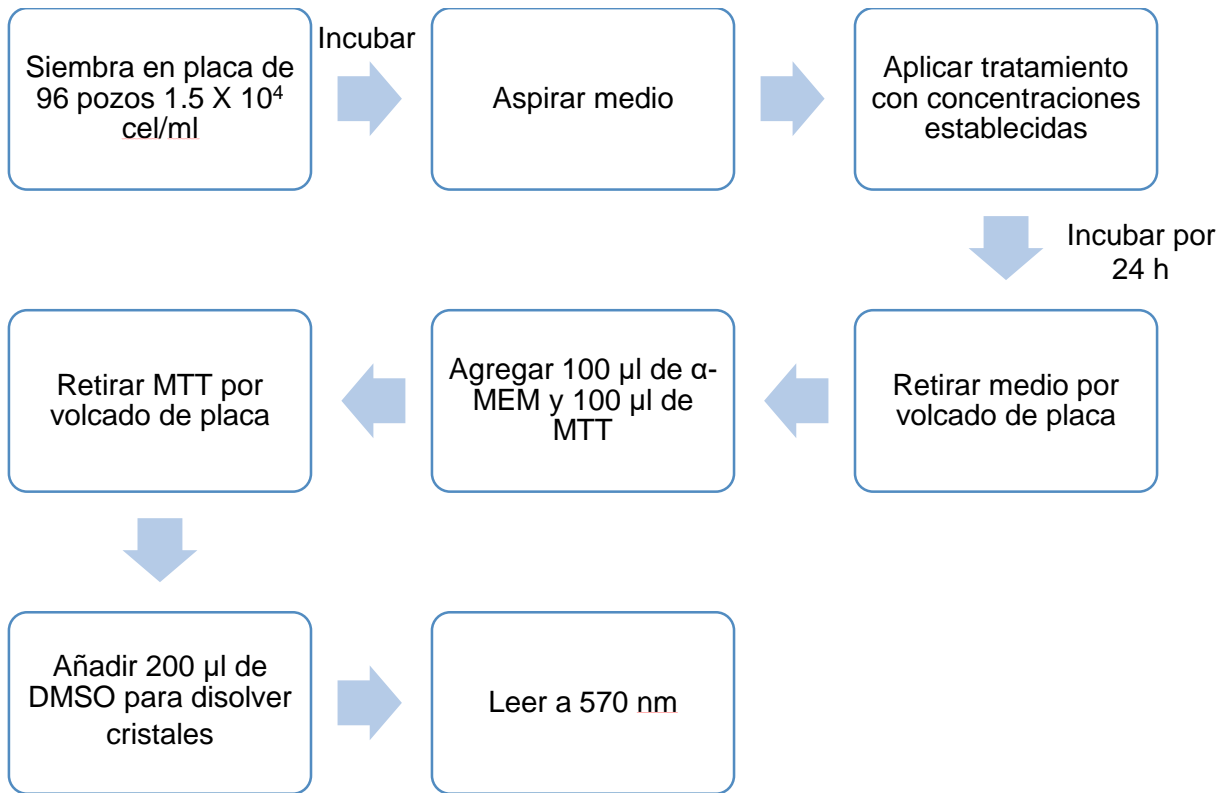


Figura 2. Condiciones experimentales del ensayo MTT

6.2.4. Cuantificación de proteína total BCA

El método del ácido bicinconínico (BCA) se basa en la detección y cuantificación colorimétrica de proteína total, el cual se empleó como un método de estandarización y normalización en las células. Este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino (reacción de Biuret) utilizando el ácido bicinconínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu^{+1} ; el cual se detecta a 562 nm (Smith, 1985).

6.3 Disfunción mitocondrial

6.3.1 Determinación de la liberación peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por medio de Amplex Red

Para la detección de H₂O₂ se empleó el kit Amplex Red, cuyo sustrato incoloro reacciona estequiométricamente con el H₂O₂ en una relación 1:1. El producto que se genera de esta reacción es resorufina, la cual se detectó por fluorescencia (Zhao *et al.*, 2012).

Las reacciones con Amplex Red se prepararon en un cuarto oscuro; de igual manera, las placas que contenían las células se mantuvieron en oscuridad o luz ambiente de laboratorio. Se lavaron las células con un amortiguador y se incubaron con la mezcla de reacción 50 µM de Amplex Red y la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) durante 30 min. La fluorescencia se detectó en el lector de microplacas Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a una longitud de onda de 560 nm.

6.3.2 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Se basa en un método fluorescente que indica la presencia de disfunción mitocondrial. Dicho método consistió en agregar a las células yoduro de 3,3'-dipropiltiadicarbocianina (DISC₃) y posteriormente se añadió carbonil cianina-3-clofenilhidrazona (CCCP) con el objetivo de desacoplar la fosforilación oxidativa esperando que aumentara el potencial de membrana mitocondrial y se emite la fluorescencia (Peña *et al.*, 2010).

6.3.3 Relación ADP/ATP

Este ensayo se basa en la detección luminiscente de los niveles intracelulares de ADP y ATP. La relación ADP/ATP proporciona un procedimiento sencillo y directo de la medición de dichos niveles. El ensayo consiste en dos pasos; en el primero de ellos, se lisan las células con el reactivo de trabajo para la liberación de ATP y ADP; en presencia de luciferina, el ATP reaccionó inmediatamente con el sustrato luciferina para producir luz. Así, la intensidad de la luz es una medida directa de la concentración de ATP intracelular. En el segundo paso, el ADP se convirtió en ATP a través de una reacción enzimática. Este ATP recién formado reaccionó con la luciferina como en el primer paso y la segunda intensidad de luz representó el ADP total y la concentración de ATP en la muestra. Un aumento en los niveles de ATP y la disminución de ADP indicaron de manera indirecta células proliferantes. Por el contrario, la disminución de los niveles de ATP y aumento de ADP representaron células apoptóticas o necróticas.

6.4 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se expresaron como media \pm error estándar (EE). Se utilizó un análisis de varianza y se compararon las medias utilizando una prueba de Dunnet comparando todos los tratamientos contra el control (células sin resveratrol). Los valores $P < 0.05$ fueron significativos. El paquete estadístico que se utilizó fue GraphPad versión 5.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito evaluar el metabolismo de glucosa y su relación con los efectos del resveratrol sobre la disfunción mitocondrial en hepatocitos de ratón Hepa1c1c7. De manera particular, se pretendió identificar el efecto que tiene la interacción entre resveratrol y glucosa en la viabilidad celular y finalmente establecer la presencia de disfunción mitocondrial, cuyo papel es central para explicar la actividad biológica del resveratrol en modelos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, dichos efectos únicamente se han observado en concentraciones elevadas de energía (glucosa y lípidos), sin considerar aquellos efectos que pudieran presentarse con un consumo estándar o bajo de energía, en los cuales se podría anular el efecto benéfico e incluso mostrar efectos tóxicos a través de la inhibición de la CTE.

VII.1. Viabilidad celular y cuantificación de proteína por ácido bicinconínico (BCA)

Se realizó una prueba colorimétrica de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT basado en la reducción metabólica del tetrazolio realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, la cual reduce el tetrazolio a formazán. Esta prueba permitió determinar la actividad metabólica de las células en diferentes concentraciones de glucosa (0.5 a 200 mM), para tener un panorama del efecto celular que tienen las diferentes concentraciones de glucosa sobre la actividad metabólica de las células. Se encontró un efecto de campana de Gauss, en el cual el punto de mayor actividad metabólica fue de 5 mM (Figura 3). Estos datos permiten observar que la concentración normal de glucosa (5 mM) es la que presenta la mayor actividad metabólica; mientras que las concentraciones baja y alta de glucosa disminuyen la actividad metabólica; lo que sugiere que, efectivamente, la variación en la concentración de glucosa tiene un efecto diferencial sobre el metabolismo de las células Hepa1c1c7. Por lo que se decidió seleccionar un rango de concentraciones de glucosa que fueran cercanas a las fisiológicas en el organismo; de tal manera que concentraciones 0.5 y 1 mM corresponden a restricción

energética, 5 mM corresponde a concentración normal y finalmente 10, 20 y 30 mM corresponden a concentraciones elevadas de energía.

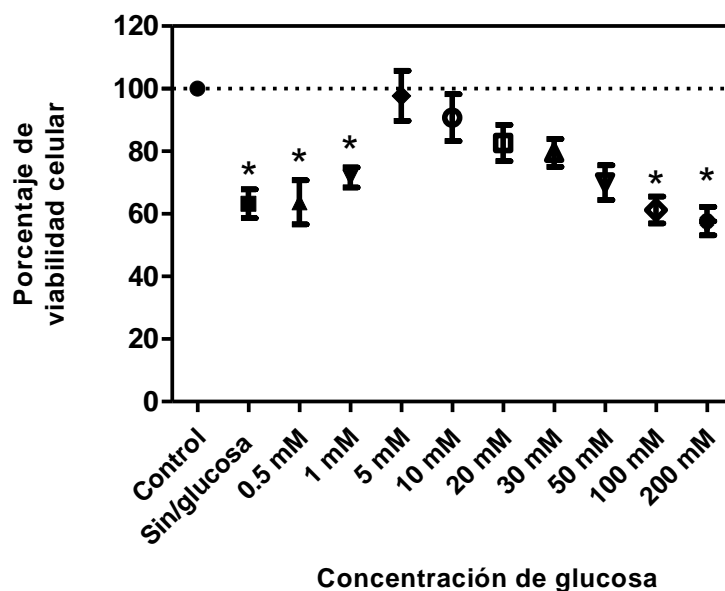
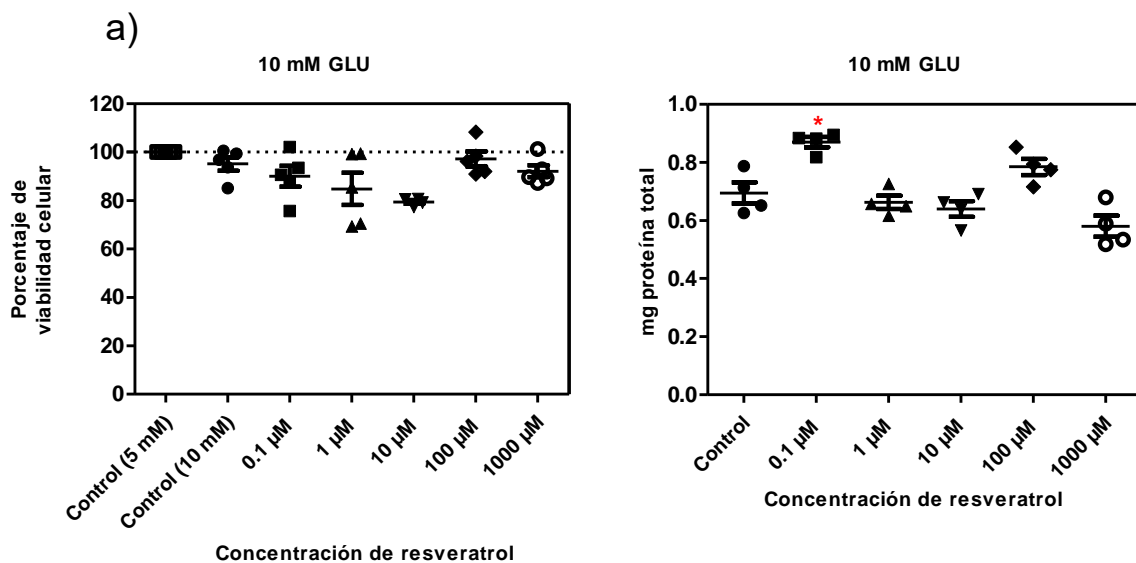


Figura 3. Efecto diferencial de la glucosa sobre la viabilidad en células Hepa1c1c7. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos comparados vs control empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de comparación de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Se ha demostrado que la glucosa en concentraciones de 100 a 200 mM tiene efecto tóxico (Fouda y Rahman, 2017) al inducir una elevada producción de ERO que tendrá como resultado estrés oxidativo, lo cual disminuye la viabilidad celular. Estos resultados confirman el efecto citotóxico de la glucosa en altas concentraciones, lo que permitió establecer el rango de concentraciones usadas para los posteriores experimentos.

Para establecer la relación entre el resveratrol y la concentración de energía (glucosa) sobre la viabilidad celular, las células se suplementaron las células con diferentes concentraciones de resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μ M) en diferentes estados energéticos (0.5 y 1 mM para concentración baja, 5 mM para la concentración estándar y 10, 20 y 30 mM para la concentración elevada). Se

encontró que en concentraciones elevadas de glucosa (10, 20 y 30 mM) la suplementación con resveratrol no afectó la viabilidad celular respecto al control (Figura 4 a, b y c). Estos resultados son de gran importancia ya que se ha demostrado en estudios epidemiológicos que el resveratrol, aunado a un consumo elevado de dietas altas en energía, tiene un efecto mimético parecido a la restricción energética, sin embargo, este hecho aún no está del todo elucidado. Por el contrario, se observa un aumento de la viabilidad celular en células suplementadas con resveratrol 0.1 μM y 1 μM en condiciones de concentraciones elevadas de glucosa de 20 y 30 mM. Este hecho ya ha sido reportado en otras investigaciones al demostrar en cardiomiocitos de rata expuestos a concentraciones elevadas de glucosa (30 mM), suplementadas con concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM de resveratrol, un aumento del 88% en el porcentaje de viabilidad celular, con respecto al control (Gou *et al.*, 2015). Así mismo, se realizó la cuantificación total de proteína por el método de BCA en células suplementadas con resveratrol y glucosa, ya que la concentración de proteína es un indicador de la cantidad de células presentes por pozo, de tal manera que se aseveró que los datos obtenidos en viabilidad celular fueron los correctos.



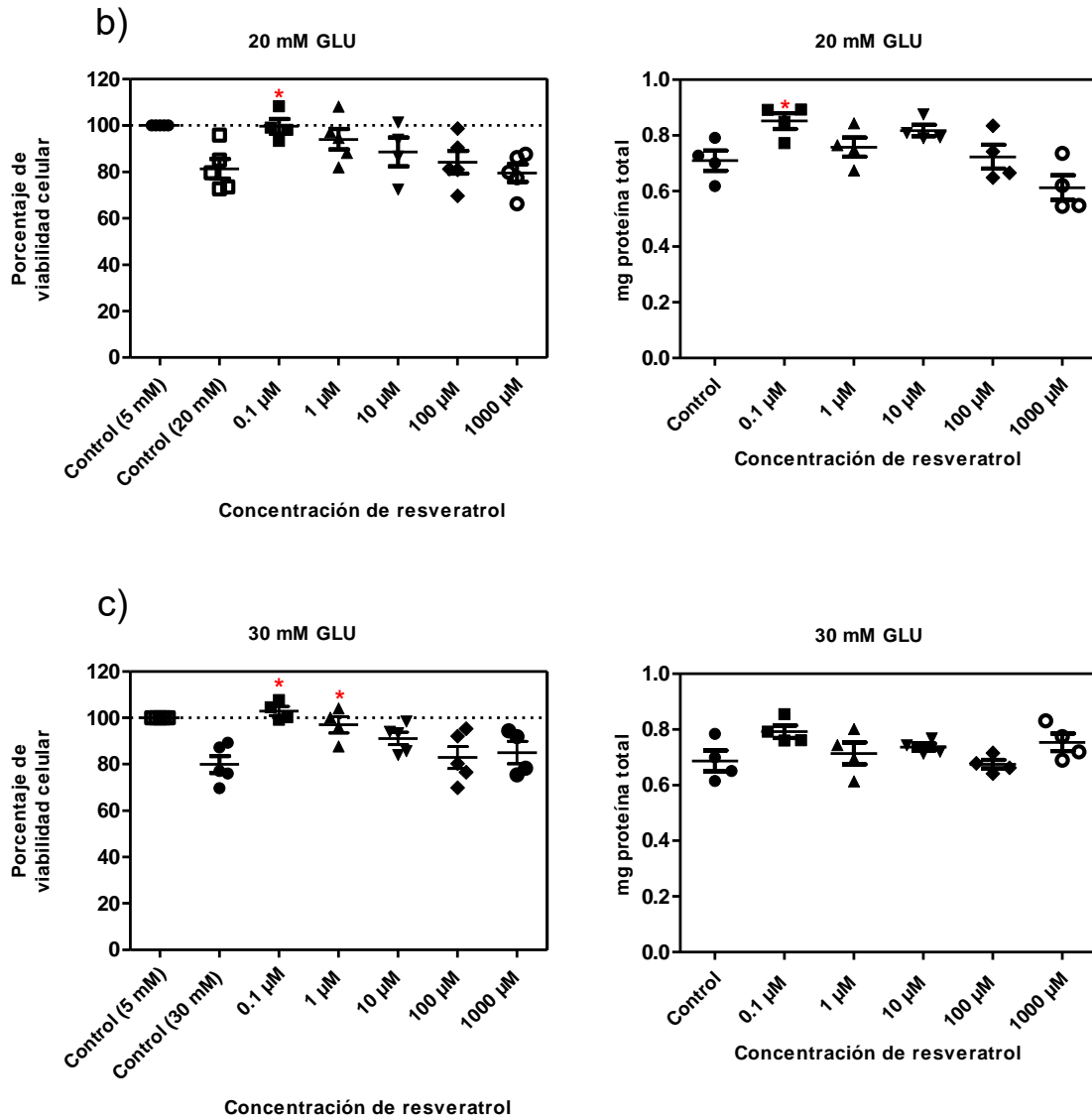


Figura 4. Efecto del resveratrol en concentraciones altas de glucosa sobre la viabilidad celular (panel izquierdo) y cuantificación de proteína total (panel derecho) en Hepa1c1c7 suplementadas con a) 10 mM de glucosa, b) 20 mM de glucosa y c) 30 mM de glucosa. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de cinco experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de comparación de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

En la concentración estándar de glucosa (5 mM), la viabilidad celular disminuye en un 22-37% solamente en una suplementación 100 y 1000 μM de resveratrol, respecto a las células control (Figura 5). De manera similar, Sheth y colaboradores (2012), al evaluar el efecto del resveratrol en células de cáncer de próstata humano en condiciones de 5 mM de glucosa y suplementadas con 5, 10, 25, 50 y 100 μM de resveratrol, observaron que la concentración más alta de resveratrol (100 μM) disminuyó la viabilidad en un 50%.

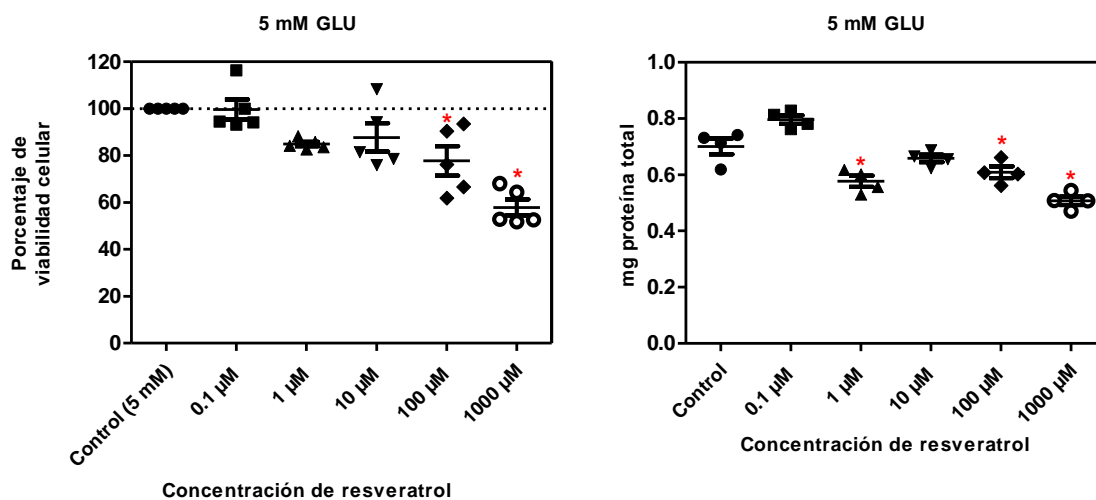


Figura 5.- Efecto del resveratrol sobre viabilidad celular (panel izquierdo) y cuantificación de proteína total (panel derecho) en Hepa1c1c7 en concentración estándar de glucosa 5 mM. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de cinco experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de comparación de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Sin embargo, bajo condiciones de restricción energética (0.5 y 1 mM de glucosa) se observó una disminución de la viabilidad celular en un 91% respecto al control, en las concentraciones 10, 100 y 1000 μM de resveratrol (Figura 6 a y b). Así mismo, Madrigal-Perez y colaboradores (2016) evaluaron la interacción entre los niveles de energía y la suplementación con resveratrol en un modelo de *Saccharomyces cerevisiae*, demostrando que, en las concentraciones de restricción energética, el resveratrol disminuye el porcentaje de viabilidad celular de manera significativa. A

su vez, se ha reportado que el resveratrol disminuye la viabilidad en células de mamíferos (Sheth *et al.*, 2012), corroborando un efecto tóxico el cual es dosis dependiente de la concentración de energía.

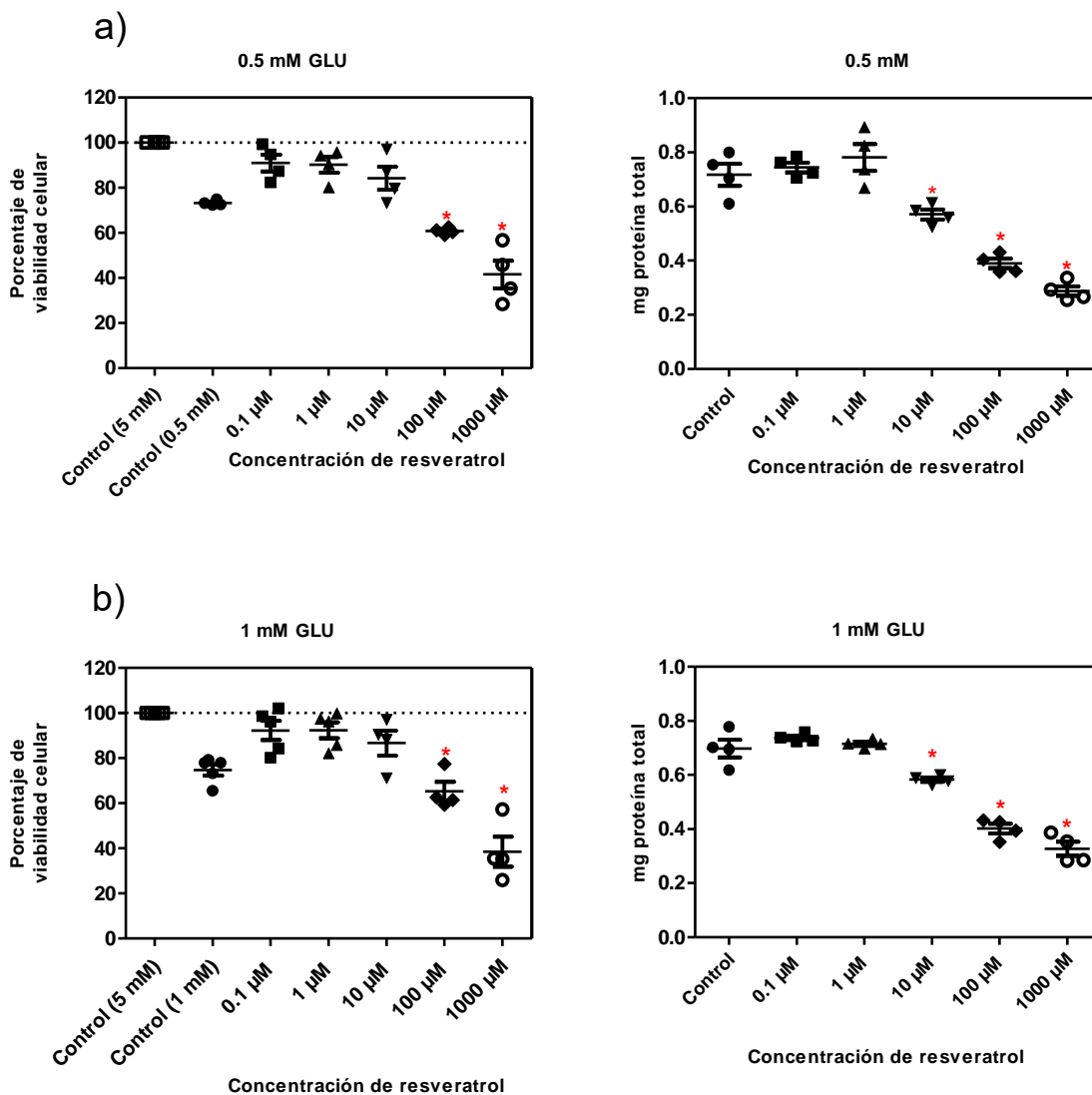


Figura 6. Efecto del resveratrol bajo condiciones de restricción energética sobre viabilidad celular (panel izquierdo) y cuantificación de proteína total (panel derecho) en Hepa1c1c7 suplementadas con: a) 0.5 mM de glucosa, b) 1 mM de glucosa, mostrando un efecto dosis dependiente de la concentración de energía. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de cinco experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de comparación de Dunnett; $P < 0.05$ vs células control.

Así mismo, es importante destacar que el efecto más perceptible en la disminución de la viabilidad celular corresponde a la concentración de 1000 μM de resveratrol, donde los efectos más severos ocurrieron en las concentraciones de restricción energética, lo cual indicaría efectos citotóxicos del resveratrol (Figura 7). Lo anterior concuerda con los hallazgos publicados por Madrigal-Perez y colaboradores (2015) en *Saccharomyces cerevisiae* al demostrar un efecto tóxico del resveratrol dependiente de la concentración de energía.

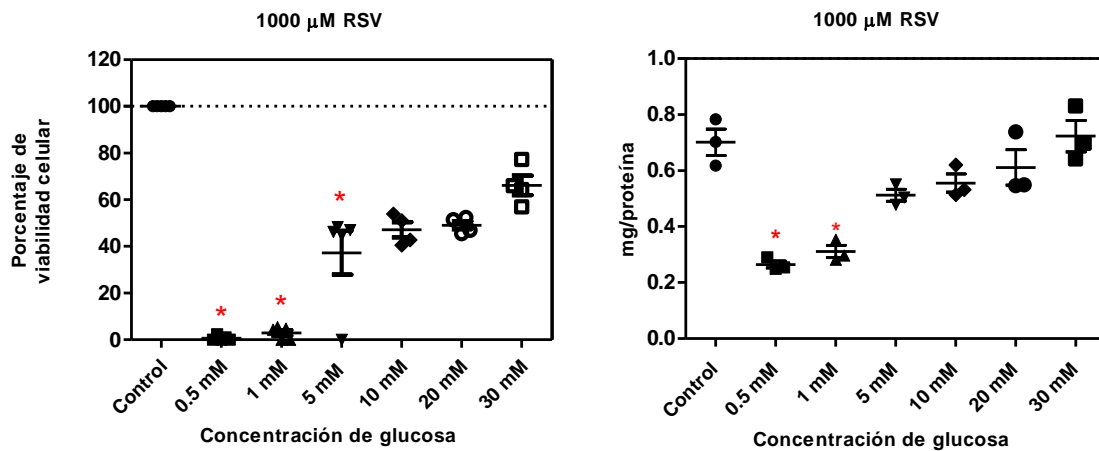


Figura 7. Efecto de la concentración 1000 μM de resveratrol sobre la viabilidad celular (panel izquierdo) y la concentración total de proteína total (panel derecho) en Hepa1c1c7 mostrando un efecto dosis dependiente de la concentración de glucosa. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de cinco experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de comparación de Dunnett; $P < 0.05$ vs células control.

Existe evidencia que sugiere que la disminución de la viabilidad celular inducida por el resveratrol en diversas líneas celulares de humano se encuentra asociada a un arresto del ciclo celular, principalmente en las fases G1 y G0 (Joe *et al.*, 2002; Baur *et al.*, 2006). Lo anterior resulta ser controversial, ya que muchos otros investigadores reportan que podría deberse a un arresto de la fase S. Sin embargo, recientes estudios han indagado la posibilidad de que este fenómeno se encuentre ligado a un estado de energía en la célula. Como lo reportado por Cai y

colaboradores (2015) quienes, al administrar a un grupo de ratones una dieta alta en grasa y otro grupo una dieta estándar, dentro de los hallazgos confirmaron que ratones alimentados con dieta estándar y dosis bajas de resveratrol presentaron una disminución en el número de adenomas en comparación con los alimentados con dieta alta en grasa, demostrando con esto un efecto protector del resveratrol contra cáncer colorrectal, el cual es dosis dependiente de la dieta.

VII.2. Liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Para establecer la relación entre la concentración de energía y la disfunción mitocondrial inducida por el resveratrol, en primera instancia se decidió medir la liberación de H_2O_2 , el cual es un indicador indirecto de la formación de ERO y por ende de la función de la CTE. Para esta cuantificación se empleó un método fluorescente. Dentro de los hallazgos se observó que en el caso de la concentración estándar (5 mM de glucosa) (Figura 8) en ninguna de las concentraciones de resveratrol se observan cambios significativos en la liberación de H_2O_2 respecto al control. La finalidad de los diversos sistemas antioxidantes es desfogar el exceso de H_2O_2 hacia los peroxisomas donde es degradado, de tal forma que existe un equilibrio en la célula.

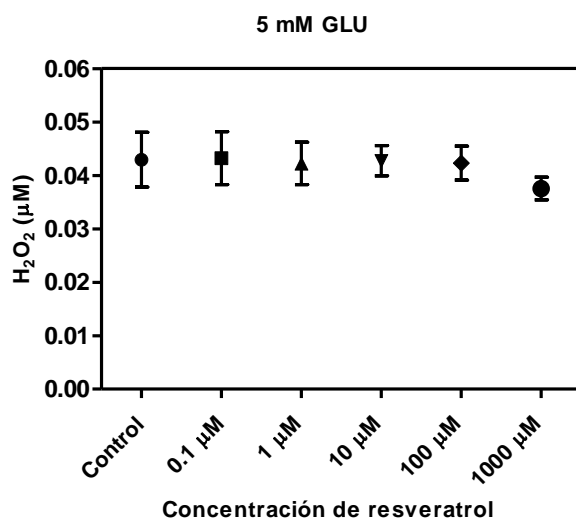


Figura 8. Efecto del resveratrol sobre la liberación de H_2O_2 en concentración 5 mM de glucosa con diferentes suplementaciones de resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μ M). Los

resultados representan la media \pm EE, obtenida de cuatro experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. No se encontró ninguna diferencia significativa.

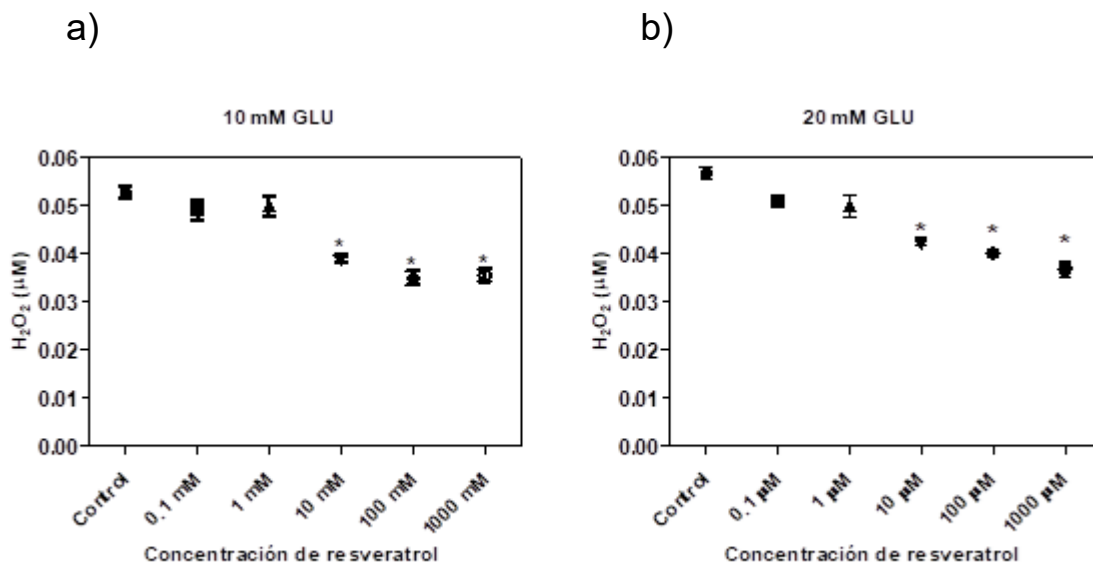
Algunas evidencias sugieren que el posible mecanismo de acción del resveratrol es la inhibición de la respiración celular (Moreira *et al.*, 2013). Esto a su vez promueve una elevación de la fuerza protón motriz en la mitocondria, ocasionando que la coenzima Q se mantenga reducida; esto suscita la generación de $O_2^{\bullet-}$ (Murphy, 2009). En este sentido, se ha demostrado que una disminución de la respiración estimula la producción de ERO en las células, como se ha reportado en células de mamífero (Hussain *et al.*, 2011), indicando que el resveratrol promueve una disfunción mitocondrial a través del incremento de ERO y un agotamiento de los sistemas antioxidantes como las enzimas MnSOD y CAT (Ingles *et al.*, 2014). Así mismo, el aumento en la generación de ERO por el resveratrol puede deberse a la inhibición de la respiración que, posteriormente, inducirá una activación de los sistemas antioxidantes como un mecanismo de defensa; sin embargo, es importante considerar que este hecho está influenciado por la cantidad de energía presente en el sistema.

Los efectos del resveratrol se pueden catalogar en dos vertientes, una de ellas es efectos antioxidantes (ejercidos a dosis bajas, $< 50 \mu\text{M}$) y efectos prooxidantes (ejercidos a dosis altas, $> 50 \mu\text{M}$). Dentro de los efectos antioxidantes, en estudios *in vitro* se ha detallado que la administración de $100 \mu\text{M}$ de resveratrol en condiciones de glucosa elevada (30 mM), donde se tiene una condición de hiperglucemia y por ende estrés oxidativo, induce la sobreexpresión de CAT lo que disminuye la concentración de H_2O_2 presente en la célula (Brand, 2016). Hay que recordar que el exceso de H_2O_2 propicia daño a la membrana, que posteriormente desencadenará el desarrollo de enfermedades mitocondriales; como diabetes, inflamación, cáncer u obesidad, entre otras.

Se observó que las células suplementadas con concentraciones elevadas de energía ($10, 20$ y 30 mM de glucosa) (Figura 9 a, b y c) presentan una disminución de ERO, respecto al control, en suplementación con $10, 100$ y $1000 \mu\text{M}$ de resveratrol. Lo anterior se ha confirmado en modelos *in vitro* empleando condiciones

de hiperglucemia (30 mM) y suplementadas con diferentes concentraciones de resveratrol (1, 10, 50 y 100 μM), señalando que el resveratrol inhibe la sobreproducción de ERO de manera dosis dependiente, siendo más representativa a partir de 100 μM (Gou *et al.*, 2014).

La glucosa elevada induce una toxicidad similar al estrés oxidativo al aumentar el potencial de membrana y, como consiguiente, propiciar la generación de ERO. Esta sobreproducción de ERO tendrá como finalidad disminuir el porcentaje de viabilidad celular; sin embargo, se ha detallado que la suplementación con resveratrol induce una disminución de ERO, por consiguiente, tendrá un efecto antioxidante como se ha reportado en diversos estudios, al disminuir en células de cáncer de hígado humano la concentración de ERO respecto a las células que no tuvieron una suplementación con resveratrol (Plauth *et al.*, 2016). En este sentido, estos resultados son consistentes con otros estudios y sugieren que el resveratrol muestra efectos antioxidantes en concentraciones a partir de 10, 100 y 1000 μM en condiciones de hiperglucemia o concentraciones elevadas de glucosa.



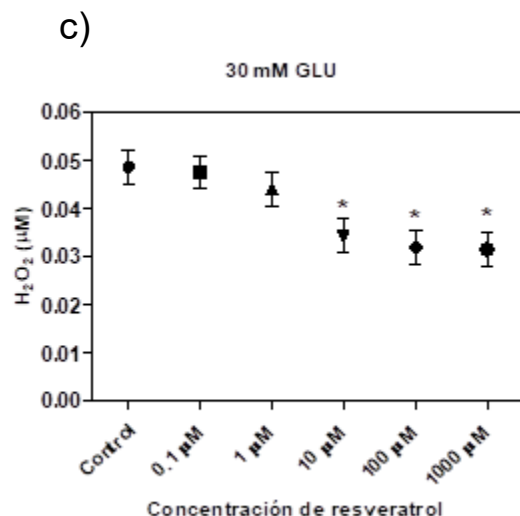


Figura 9. Efecto del resveratrol sobre la liberación de H₂O₂ en células Hepa1c17: a) 10 mM de glucosa, b) 20 mM de glucosa y c) 30 mM de glucosa con diferentes concentraciones de resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 µM); demostrando un efecto dosis dependiente de concentraciones de energía respecto al control (sin resveratrol). Los resultados representan la media ± EE, obtenida de cuatro experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Bajo condiciones de restricción energética se espera que el resveratrol resulte ser tóxico para la mitocondria. De tal forma que, un blanco molecular del resveratrol estaría vinculado probablemente a la inhibición de la respiración mitocondrial y por ende un aumento en la producción de ERO. Se ha demostrado en mitocondrias aisladas de hígado de ratas que la suplementación de resveratrol disminuye la actividad de complejo I (Zini *et al.*, 1999). Este hecho es interesante, ya que este complejo es el encargado de transportar electrones hacia la F₁F₀-ATPasa, y es uno de los complejos donde se genera el O₂^{•-}. Por lo tanto, es de esperar que si se inhibe el complejo I habría una disminución en el transporte de electrones y, por consiguiente, menor número de moléculas donadoras de electrones (NADH, FADH) que generen O₂^{•-} en la mitocondria y a su vez menor estrés oxidativo. Por tanto, bajo estas condiciones se habla de un efecto antioxidante, el cual es ampliamente reportado por la literatura (Gou *et al.*, 2014).

En condiciones de restricción energética (0.5 y 1 mM de glucosa) (Figura 10 a y b) se observó un aumento en la producción de ERO en concentraciones mayores a 10 μM de resveratrol, lo que corrobora el hecho de que bajo restricción energética y la suplementación de resveratrol se disminuye el porcentaje de viabilidad celular, confirmando de esta manera un efecto prooxidante del resveratrol dependiente de la concentración de glucosa. De manera similar, este fenómeno ha sido reportado por Ramos-Gómez y colaboradores (2017) en *S. cerevisiae* bajo restricción energética y suplementadas con resveratrol, observando un aumento en la liberación de H_2O_2 .

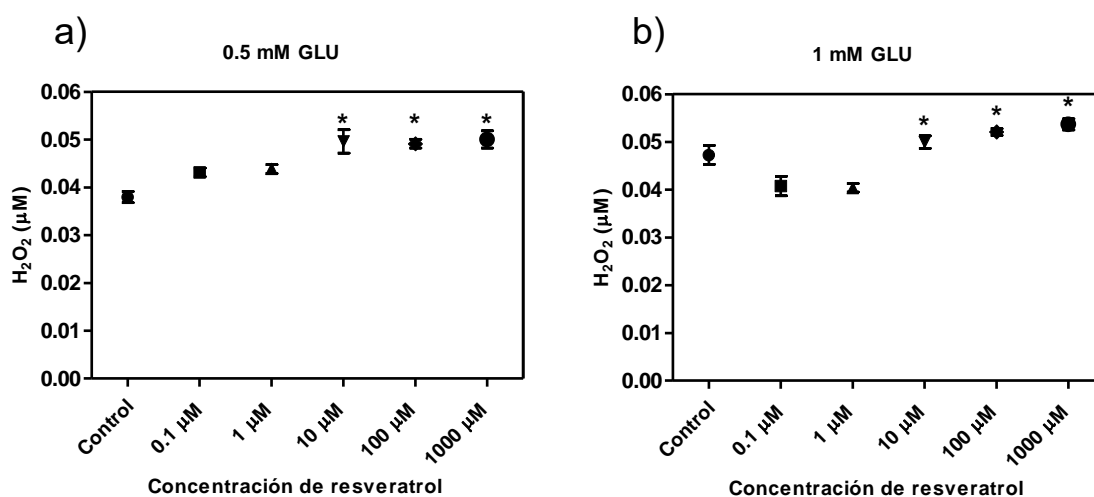


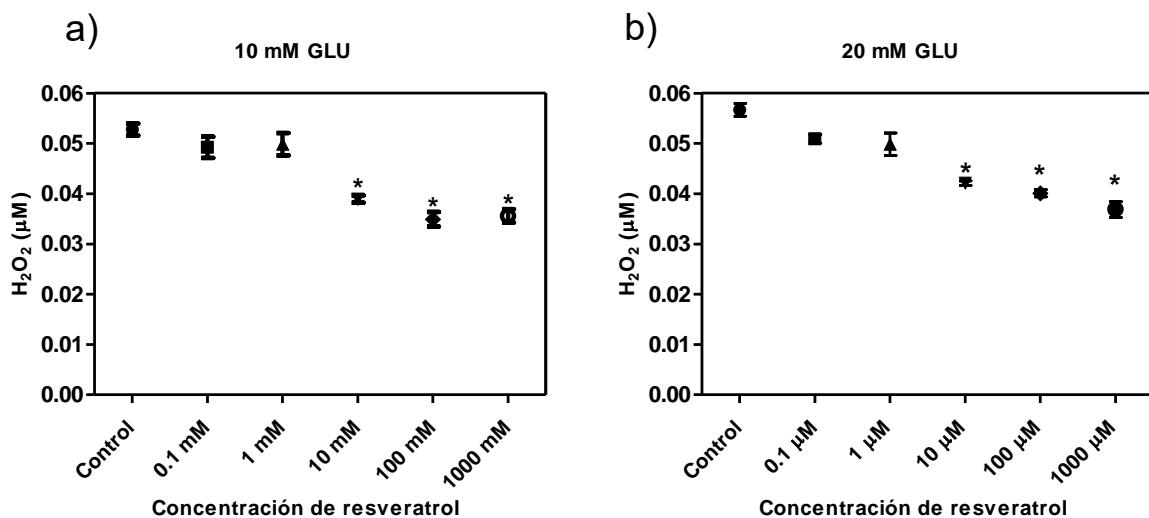
Figura 10. Efecto del resveratrol en restricción energética sobre la cuantificación de H_2O_2 liberado en células Hepa1c17; a) 0.5 mM de glucosa, b) 1 mM de glucosa con diferentes concentraciones de resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μM). Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de cinco experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno. Los asteriscos representan los datos estadísticamente significativos empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Es de esperar que la disfunción mitocondrial ocasionada por el resveratrol disminuya la producción de ATP, seguido de una generación de ERO. Dicho efecto se ha reportado en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, donde se ha observado una disminución en la actividad del complejo V (Rowley *et al.*, 2013). En general, los resultados demuestran que existe un efecto del resveratrol sobre la liberación de H_2O_2 dependiente de la concentración de energía.

VII.3. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es producto de las transformaciones redox asociadas con la actividad del ciclo de Krebs para producir ATP (Zoroba *et al.*, 2017). Así mismo, determinar el potencial de membrana mitocondrial arroja datos importantes sobre el estado fisiológico de la célula y la función de las mitocondrias. Por lo tanto, la evaluación del potencial de membrana mitocondrial resultó ser crucial para comprender los efectos del resveratrol.

Los resultados de este estudio mostraron que cuando existen condiciones de hiperglucemia (10, 20 y 30 mM de glucosa) se incrementa la actividad metabólica, ya que hay mayor cantidad de sustrato oxidable. Por lo tanto, existe un mayor flujo de electrones y protones, lo cual tendrá como consecuencia que aumente el potencial de membrana mitocondrial, debido a la acumulación excesiva de protones y electrones en el espacio intermembranal. En relación a las células suplementadas con resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μM) (Figura 11 a, b y c), se observó que el potencial de membrana mitocondrial aumenta en las diversas concentraciones de resveratrol; este resultado puede ser explicado por el hecho que el resveratrol estaría inhibiendo a la F_1F_0 -ATPasa, generando una disminución en la generación de ATP.



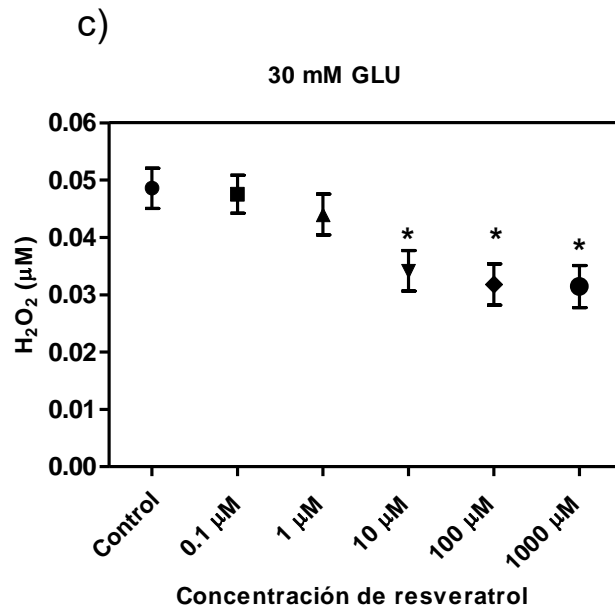


Figura 11. Efecto del resveratrol sobre el potencial de membrana mitocondrial en: a) 10 mM de glucosa, b) 20 mM de glucosa y c) 30 mM con suplementación de resveratrol (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μM). Los resultados representan la media ± EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Así mismo, en la concentración estándar de glucosa (Figura 12) al existir una apropiada cantidad de sustrato oxidable, la CTE resulta ser eficiente; por lo tanto, el resveratrol aumenta el potencial de membrana mitocondrial respecto al control, pero no de forma significativa, lo que corrobora que existe un funcionamiento adecuado de la CTE, ya que células normales deben mantener un elevado potencial de membrana para satisfacer sus necesidades de ATP (Zoroba *et al.*, 2017).

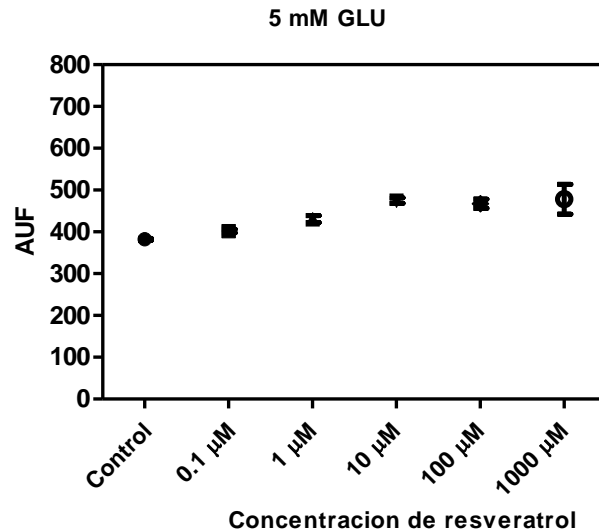


Figura 12. Efecto del resveratrol sobre el potencial de membrana mitocondrial determinado en células Hepa1c1c7 bajo condiciones estándar de glucosa (5 mM). Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Finalmente, bajo condiciones de restricción energética (0.5 y 1 mM) se espera que al haber poco sustrato oxidable (glucosa), exista un menor número de donadores electrónicos (protones, electrones) transportándose a través de la CTE. Por lo tanto, se planteó que el resveratrol pudiera interrumpir el flujo de electrones y de esta forma inhibir el potencial de membrana mitocondrial. El potencial de membrana mitocondrial en concentraciones elevadas de energía es alto en comparación con el potencial de membrana mitocondrial de la concentración que corresponde a restricción energética (Figura 13 a y b), lo que sugiere que el resveratrol efectivamente altera la CTE.

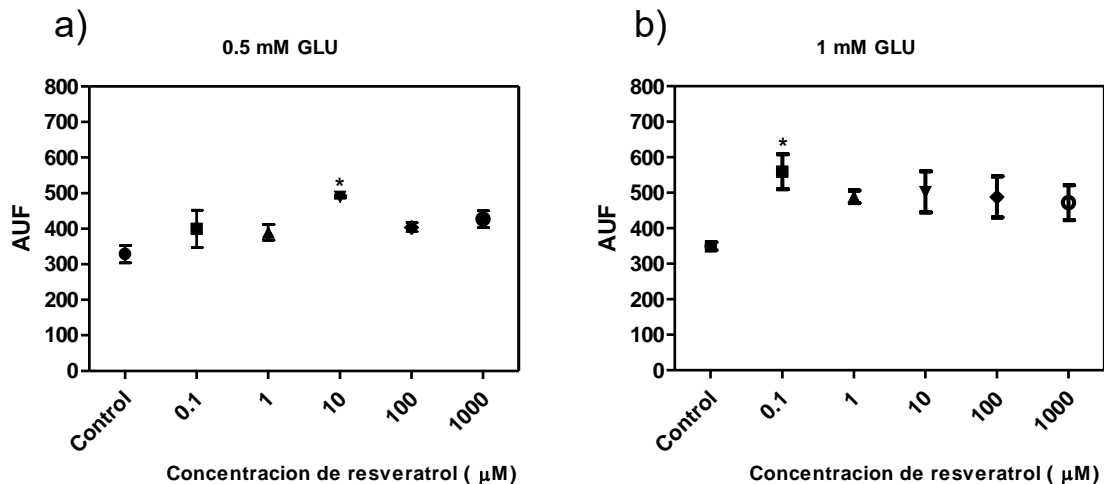


Figura 13. Efecto del resveratrol sobre el potencial de membrana mitocondrial en restricción energética: a) 0.5 mM de glucosa y b) 1 mM de glucosa. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Si bien estos resultados corroboran los datos publicados por Madrigal-Perez y colaboradores (2017) en un modelo de *Saccharomyces cerevisiae*, hasta el momento los resultados derivados del presente proyecto sustentan por primera vez en una línea celular hepática los efectos prooxidantes del resveratrol en la mitocondria bajo condiciones de restricción energética.

VII.4 Relación ADP/ATP

La relación ADP/ATP proporciona información importante acerca del estado metabólico de la célula, ya que determina el ATP libre disponible para realizar múltiples reacciones celulares, por ejemplo, la biogénesis de proteínas mitocondriales y la fosforilación oxidativa, entre otros (Lu *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos mostraron que en condiciones de hiperglucemia (10 y 30 mM de glucosa), disminuye la relación ADP/ATP (Figura 14 a y c) cuando se suplementa con resveratrol, sin embargo, tal efecto únicamente se observa en las suplementaciones con 0.1, 1 y 10 μ M. Mientras que, las suplementaciones con 100

y 1000 μM de resveratrol aumentan la relación ADP/ATP, sugiriendo que el incremento en la relación ADP/ATP pueden deberse a la inhibición de la actividad de la F_1F_0 -ATPasa.

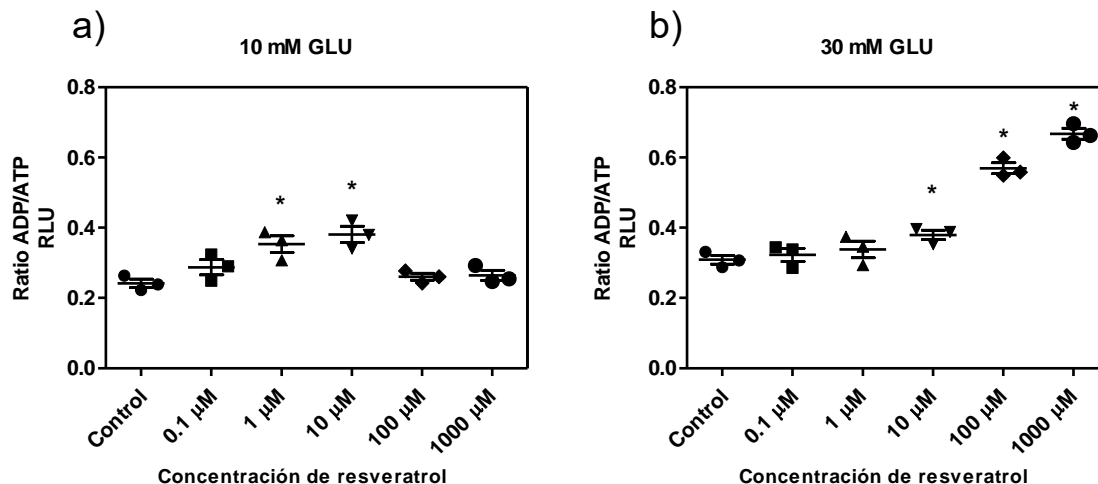


Figura 14. Efecto del resveratrol sobre la relación ADP/ATP en: a) 10 mM de glucosa y b) 30 mM de glucosa. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

En el caso de la concentración estándar de glucosa (5 mM), se observa un incremento en la relación ADP/ATP a partir de la suplementación de resveratrol 1, 10, 100 y 1000 μM , debido al estrés celular generado por el mismo. Lo que indica que existe un desequilibrio entre la tasa de producción de ATP y la tasa de consumo de ATP, ocasionando estrés celular que propiciará la activación de varias enzimas glucolíticas (Hardie, 2008).

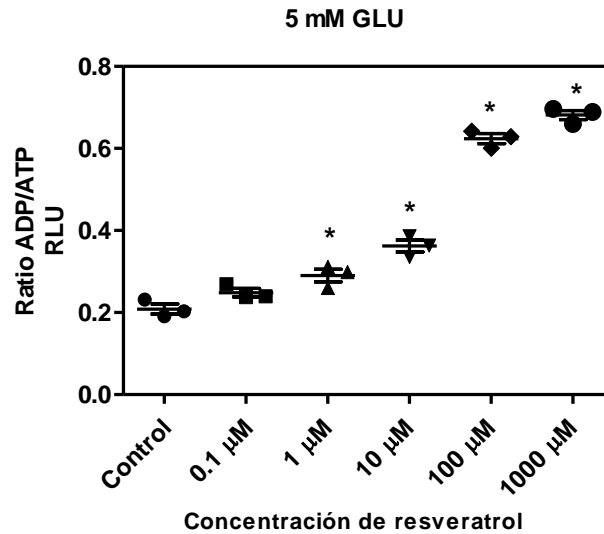


Figura 15. Efecto del resveratrol sobre la relación ADP/ATP determinado bajo condiciones estándar de glucosa (5 mM). Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

En relación a la restricción de energía (0.5 y 1 mM de glucosa), la concentración más baja de resveratrol (0.1 y 1 μ M) mantiene una relación ADP/ATP baja en comparación con las suplementaciones más altas de resveratrol, este hecho ha sido reportado por Mizuguchi 2017 en fibroblastos. Sin embargo, las suplementaciones de resveratrol 100 y 1000 μ M aumentan la relación ADP/ATP, por una disminución en la producción de ATP, lo que podría explicar sus efectos tóxicos. Estos hechos han sido demostrados en células HeLa expuestas a concentraciones elevadas de resveratrol (≥ 50 μ M), así como en mitocondrias aisladas de hígado y cerebro de rata, encontrando que el resveratrol es capaz de inhibir la actividad de la F_1F_0 -ATPasa (Zhen y Ramírez, 2000), lo que podría provocar muerte celular por apoptosis o necrosis, dependiendo del grado de inhibición, ya que la apoptosis es un proceso activo, es decir, requiere ATP y la necrosis se debe a consecuencia de niveles insuficientes de ATP dentro de la célula (De Oliveira *et al.*, 2016).

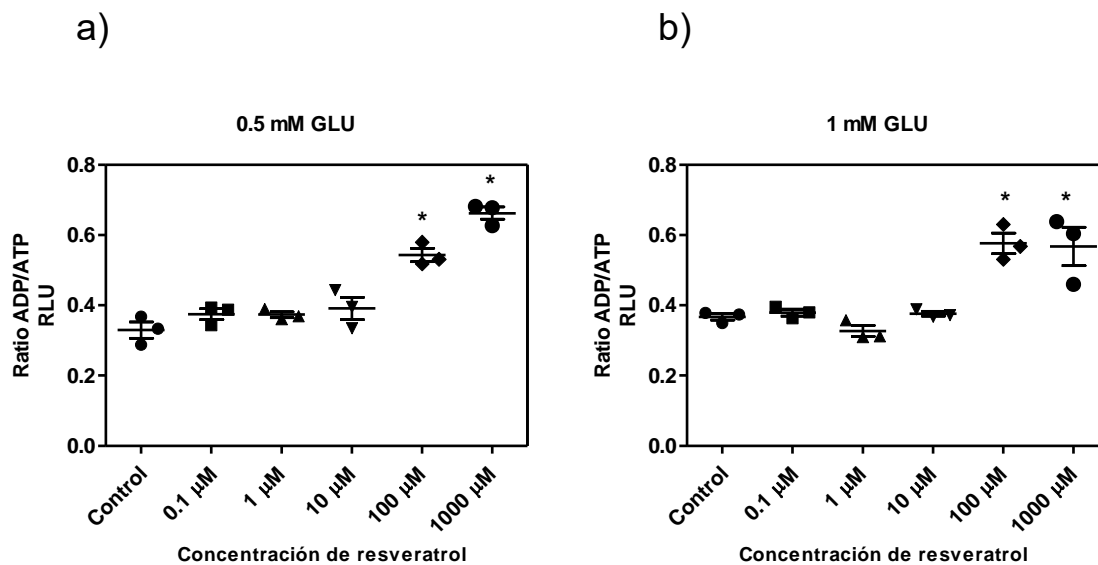


Figura 16. Efecto del resveratrol la relación ADP/ATP en restricción energética: a) 0.5 mM de glucosa y b) 1 mM de glucosa. Los resultados representan la media \pm EE, obtenida de tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas cada uno empleando un análisis ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet; $P < 0.05$ vs células control.

Estos datos, en resumen, demuestran que el resveratrol altera la función mitocondrial que conduce a un desequilibrio energético, una posible fuga de electrones, lo que puede dar como resultado una mayor generación de ERO.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados del presente proyecto confirman por primera vez en una línea celular de mamíferos que la viabilidad celular disminuye de forma dependiente de la concentración de energía y que la presencia de ERO puede estar vinculada a la disminución de la respiración celular, lo que podría explicar el efecto prooxidante del resveratrol. Sin embargo; es necesario la determinación de consumo de oxígeno y la producción de lactato, entre otros experimentos, para aportar mayor información que permita explicar con mayor detalle dicho fenómeno y que soporte la idea de que el blanco molecular del resveratrol está vinculado a la respiración.

Las concentraciones bajas de glucosa y altas de resveratrol inducen una disfunción mitocondrial, probablemente debido a la carencia de moléculas donadoras de electrones necesarias para la generación de ATP por la CTE. Aunado a esto, el resveratrol, al ser una molécula lipofílica que se encuentra bloqueando la generación de ATP y disminuyendo la respiración, estaría ocasionando una disfunción mitocondrial.

A su vez, se encontró que concentraciones elevadas de energía y altas de resveratrol aumentan la viabilidad de las células, de tal manera que se puede decir que existe un efecto positivo sobre proliferación celular, como lo previamente reportado por otros estudios, ya que las células utilizadas en este estudio son transformadas. Para lo anterior, se sugiere el empleo de concentraciones bajas y normales de energía (5 mM) y 1000 μ M de resveratrol, las cuales, disminuyen el porcentaje de viabilidad celular, por lo tanto, sería conveniente en padecimientos relacionados a enfermedades mitocondriales, como, el cáncer.

Los resultados derivados del presente estudio corroboran que la concentración de energía es un determinante clave para los efectos tanto benéficos como dañinos del resveratrol y éste a su vez sobre la disfunción mitocondrial.

A partir de los estudios y discusiones presentados en el presente proyecto de investigación, las perspectivas de trabajo se orientan en indagar más sobre los efectos del resveratrol en condiciones de restricción energética, a fin de seguir

solventando la hipótesis de que el blanco molecular del resveratrol está vinculado a la CTE. Otro punto relevante sería indagar sobre el almacenamiento de este polifenol en las membranas lipídicas, ya que se sabe que el resveratrol presenta propiedades lipofílicas. Finalmente, sería de interés la realización de un estudio con el uso de otros polifenoles que hasta el momento se han considerado antioxidantes, a fin de entender a mayor detalle el comportamiento de los mismos y posibles efectos tanto tóxicos como benéficos en modelos *in vitro* e *in vivo*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja I, Kissen R, Bones AM. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci*; 17: 73-90.
- Akkinson NJ, Urwin PE. 2012. The interaction of biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot*; 63: 3523-3544.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*; 55: 373-399.
- Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. 2007. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer protection. *Toxicol Appl Pharmacol*; 224: 274-283.
- Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L. 2007. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*; 128: 546-552.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, *et al.* 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*; 444: 337-342.
- Baur JA, Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 493-506.
- Brand MD. 2017. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*; 100; 14-31.
- Brand MD, Nicholls DG. 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*; 435: 297-312.
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agr Food Chem*; 50: 3337-3340.

- Cai H, Scott E, Kholghi A, Andreadi C, Rufini A, Karmokar A, James M. 2015. Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci Transl Med*; 7: 298ra117.
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Kartal ON. 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Pharmacol*; 3: 1-18.
- Cheng AS, Cheng YH, Chang TL. 2013. Resveratrol protects RINmSF pancreatic cells from methylglyoxal-induced apoptosis. *J Funct Foods*; 5: 1774-1783.
- Chiou YS, Wu JC, Huang Q, Shahidi F, Wang YJ, Ho CT. 2014. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. *J Funct Foods*; 7: 3-25.
- Chun FW, Jing YY, Fang W, Xiao XW. 2013. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *J Nat Med*; 11:1-15.
- Chung JH. 2012. Metabolic benefits of inhibiting c-AMP-PDEs with resveratrol. *Adipocyte*; 1: 256-258.
- Dey P, Harborne J, Banthorpe D. 1991. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, London; 1: 152.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*; 82: 47-95.
- Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM, Bonfrate M, Ferrara F, De Catarina R, *et al.* 1998. Activity *in vitro* of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr*; 68: 1208-1214.
- Fouda MA. y Abdel-Rahman AA. 2017. Endothelin confers protection against high glucose-induced neurotoxicity via alleviation of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*; 361: 130-139.
- Gallis JL, Serhan N, Gin H, Couzigou P, Beauvieux MC. 2012. Resveratrol plus ethanol counteracts the ethanol-induced impairment of energy metabolism: ³¹

- P NMR study of ATP and n-glycerol-3-phosphate on isolated and perfused rat liver. *J Ital Pharmacol Soc*; 65: 387-395.
- Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami, M, Viña, J. 2013. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*; 48: 79-88.
- Giacco F, Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*; 107: 1058-1070.
- Grayer JR, Kokubun T. 2001. Plant-fungal interactions: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochem*; 56: 253-263.
- Gueguen N, Desquinet-Dumas V, Leman G, Chupin S, Baron S, Nivet-Antoine V, Vessières E, Ayer A. 2015. Resveratrol directly binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondrial of age mice. *PLoS ONE*; e01444290: 1-19.
- Guo S, Yao Q, Ke Z, Chen H, Wu J, Liu C. 2015. Resveratrol attenuates high glucose-induced oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis through AMPK. *Mol Cell Endocrinol*; 412: 85-94.
- Hadi SM, Ullah MF, Azmi AS. 2010. Resveratrol mobilizes endogenous cooper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharm Res*; 27: 979-988.
- Hardie DG. 2008. AMPK: a key regulator energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes*; 32: 7-12.
- Hardie DG. 2011. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr*; 93: 891-896.
- Hardie DG. 2015. AMPK: positive and negative regulation and its role in whole body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*; 33: 1-7.

- Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green AK, Evans A, Fogarty S, Towler MC, Brown JL, *et al.* 2010. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab*; 11: 554-565.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, *et al.* 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*; 425: 191-196.
- Hussain AR, Uddin S, Bu R, Khan OS, Ahmed SO, Ahmed M, Al-Kuraya KS. 2011. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. *PLoS ONE*; 6: e24703.
- Inglés M, Gambini J, Graca M, Bonet CV, Abdelaziz MK, Alami M, Viña J, Borrás C. 2014. PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations. *Biomed Res Intern*; 2014: 1-6.
- Jeandet P, Delaunois B, Aziz A, Donnez D, Vasserot Y, Cordelier S, Courot E. 2012. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *J Biomed Biochem*; 212: 1-14.
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. 2002. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agr Food Chem*; 50: 2731-2741.
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. 2002. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agr Food Chem*; 50: 2731-2741.
- Jeandet P, Hebrard C, Deville MA, Cordelier S, Dorey S, Aziz A, Crouzet J. 2014. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules*; 19: 18033-18056.

- Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. 2002. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*; 8: 893-903.
- Klaus V, Hartmann T, Gambini J. 2010. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Arch Biochem Biophysics*; 496: 93-100.
- Kulkarni SS & Cantó C. 2014. The molecular target of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*; 1852: 1114-1123.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart HZ, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, *et al.* 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*; 127: 1109-1122.
- Lephart ED, Sommerfeldt JM, Andrus MB. 2014. Resveratrol: Influences on gene expression in human skin. *J Funct Foods*; 10: 377-384.
- Liu BL, Zhang X, Zhang W, Zhen HN. 2007. New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anticancer therapy. *Cancer Biol Ther*; 6: 1833-1836.
- Madrigal-Perez LA, Canizal-Garcia M, Gonzales-Hernandez JC, Reynoso-Camacho R, Nava GM, Ramos-Gomez M. 2016. Energy-dependent effects of resveratrol in *Saccharomyces cerevisiae*; *Yeast*; 33: 227-234.
- Madrigal-Perez LA, Nava GM, Gonzalez-Hernandez JC, Ramos-Gómez M. 2015. Resveratrol increases glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* via a SNF1-dependent mechanism. *J Bioener Biomembr*; 47: 331-336.
- Madrigal-Perez LA, Ramos-Gomez M. 2016. Resveratrol inhibition of cellular respiration: new paradigm for an old mechanism. *Int J Mol Sci*; 17: 368.
- Magder S. 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*; 10: 208.

- Mithofer A, Schulze B, Boland W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett*; 21: 1-3.
- Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sardão VA. 2013. Resveratrol affects differently rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress *in vitro*: investigation of the role of gender. *Food Chem Toxicol*; 53: 18-26.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65: 55-63.
- Muller KO, Borger H. 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz, Berlin-Dahlem; 23: 189-231.
- Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*; 417: 1-13.
- Nicholls D, Ferguson S. 2013. Bioenergetics. Academic Press, Amsterdam; 4: 434.
- Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. 1963. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of *Polygonum cuspidatum*. *Yakugazu Zasshi*; 83: 988-990.
- Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. 1999. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol*; 68: 71-76.
- Peña A, Sánchez NS, Calahorra M. 2010. Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *J Bioenerg Biomembr*; 42: 419-432.
- Peng W, Qin R, Li, X, Zhou H. 2013. Botany, phytochemistry, pharmacology and potential application of *Polygonum cuspidatum*: A rev. *J Ethnopharmacol*; 148: 729-745.

- Plauth A, Geikowski A, Cichon S, Wowro SJ, Liedgens L, Rousseau M, Lotito S. 2016. Hormetic shifting of redox environment by pro-oxidative resveratrol protects cells against stress. *Free Radic Biol Med*; 99: 608-622.
- Poels J, Spasic MR, Callaerts P, Norga KK. 2009. Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy. *Bioessays*; 31: 944-952.
- Porter KE, Riches K. 2013. The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes? *Clin Sci*; 125: 167-182.
- Puissant A, Robert G, Fenouill N, Luciano F, Cassuto JP, Raynaud S, Auberger P. 2010. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res*; 70: 1042-1052.
- Rafikov R, Sun X, Rafikova O, Meadows ML, Desai AA, Khalpey Z, Yuan JX, Fineman JR, *et al.* 2015. Complex I dysfunction underlines the glycolytic switch in pulmonary hypertensive smooth muscle cells. *Redox Biol*; 6: 278-286.
- Ramos-Gomez M, Olivares-Marin IK, Canizal-García M, Gonzalez-Hernandez J C, Nava GM, Madrigal-Perez LA. 2017. Resveratrol induces mitochondrial dysfunction and decreases chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* in a glucose-dependent manner. *J Bioenerg Biomembr*; 49: 241-251.
- Rocha KK, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL. 2009. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol*; 47: 1362-1367.
- Rong G, Weiming L, Baoxin L, Shuang L, Buchun Z, Yamei X. 2014. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation *in vitro*. *Med Sci Monit Basic Res*; 20: 82-92.

- Rowley S, Patel M. 2013. Mitochondria involve vet and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med*; 62: 121-131.
- Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. 2008. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*; 591: 1-3.
- Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, Seo BB, LeBoeuf SE, Gay LJ, Yagi T, Felding-Habermann B. 2013. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest*; 3: 1068-1081.
- Sassi N, Mattarei A, Azzolini M, Szabo I, Paradisi C, Zoratti M, Biasutto L. 2014. Cytotoxicity of mitochondria targeted resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*; 1837: 1781-1789.
- Schneider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gossé F, Bergmann C, Seiler N. 2000. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett*; 158: 85-91.
- Sheth S, Jajoo S, Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Rybak LP, Ramkumar V. 2012. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway. *PLoS ONE*; 7: e51655.
- Smith PK. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150: 76-85.
- Svensson K, Schnyder S, Albert V, Cardel B, Quagliata L, Terracciano LM, Handschin C. 2015. Resveratrol and SRT1720 elicit differential effects in metabolic organs and modulate systemic parameters independently of skeletal muscle peroxisome proliferator activated receptor γ Co-activator 1 α (PGC-1 α). *J Biol Chem*; 290: 16059-16079.
- Taiz L, Zeiger E. 2003. Plant physiology. *Ann Bot*; 91: 750-751.

- Takaoka MJ. 1940. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum loes. fil*). J Fac Sciec; 3: 1-16.
- Trela BC, Waterhouse AL. 1996. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. J Agr Food Chem; 44: 1253-1257.
- Trumpower BL. 1990. The proton motive Q cycle: energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. J Biol Chem; 20: 11409-11412.
- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A. 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol; 16: 296-300.
- Wallace DC. 1992. Disease of the mitochondrial DNA. Annu Rev Biochem; 61: 1175-1212.
- Weiked AK, Ruderman BN, Cacicedo MJ. 2016. Unraveling the action of AMP-activated protein kinase in metabolic disease: Systemic to molecular insights. Metabolism; 65: 634-645.
- Wolter F, Ulrich S, Stein J. 2004. Molecular mechanisms of the chemo preventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer: key role of polyamines. J Nutr; 134: 3219-3222.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature; 430: 686-689
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nat; 430: 686-689
- Woods A. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Curr Biol; 13: 2004-2008.

- Wu Q, VanEtten HD. 2004. Introduction of plant and fungal genes into pea (*Pisum sativum* L.) hairy roots reduces their ability to produce pisatin and affects their response to a fungal pathogen. *Mol Plant-Microbe Interact*; 17: 798-804.
- Xu Z, Zhang L, Li X, Jiang Z, Sun L, Zhao G, Zhou G, Zhang H, *et al.* 2015. Mitochondrial fusion/fission process involved in the improvement of catalpol on high glucose-induced hepatic mitochondrial dysfunction. *Acta Biochem Biophys Sin*; 47: 730-740.
- Zhao B, Summers FA, Mason RP. 2012. Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light. *Free Radic Biol Med*; 53: 1080-1087.
- Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AE, Tillement JP. 1999. Effect of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drug Exp Clin Res*; 25: 87-97.
- Zoroba LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankuaskas SS, Babenko VA, Zorov SD, *et al.* 2017. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*, doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.

X. ANEXOS

Anexo 1. Condiciones de cultivo de hepatocitos de ratón

Línea celular: Hepa1c1c7

Medio: α -MEM adicionado con 10% de SFB y 1% de penicilina-estreptomicina (100 mg/ml). El medio debe ser esterilizado por filtración, mantenerse a una temperatura no mayor a 4 °C y pH óptimo de 7.4.

Atmósfera controlada de 95%, 5% de CO₂, humedad relativa de 95%.

El medio se descarta cada 2 a 3 días, el objetivo del cambio de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de desechos tóxicos propios de las células.

Anexo 2. Viabilidad celular por medio de ensayo de MTT

El ensayo MTT bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ido)-2,5-difeniltetrazolio) es una técnica sencilla que se usará para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble el formazán, el cual queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma se cuantificará la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de la mitocondria y su actividad funcional es interpretada como una medida de viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de la exposición a un compuesto permitirá obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evaluará. El periodo de exposición de la sustancia de ensayo puede variar; pueden ser periodos cortos (1 a 2 h) o largos (24 a 72 h).

Para una placa de 96 pozos el ensayo MTT: Se prepararán 10 mg en 10 ml de medio de MTT y se disuelve.

1. Se retirará el medio de cultivo por volcado de placa y se dan 3 lavadas con PBS 1X
2. Agregar 100 μ l de medio α -MEM y 100 μ l de MTT
3. Incubar por 2 h (tapar placa con papel aluminio)
4. Posterior a las 2 h, retirar el MTT por volcado de placa
5. Añadir 200 μ l de DMSO para disolver cristales
6. Re suspender los cristales (cuidado de no generar burbujas)
7. Leer a 570 nm en espectrofotómetro