



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“Efecto protector del resveratrol sobre la acumulación de lípidos  
y estado redox en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática  
suplementado con medio condicionado de macrófagos M2”**

**TESIS**

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
**Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Presenta:**

L.N. Ximena Ávalos Márquez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

Santiago de Querétaro, Qro., a febrero de 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Efecto protector del resveratrol sobre la acumulación de  
lípidos y estado redox en un modelo in vitro de  
esteatosis hepática suplementado con medio  
condicionado de macrófagos M2

**por**

Ximena Ávalos Márquez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-300228-0323-223



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Efecto protector del resveratrol sobre la acumulación de lípidos y estado redox en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática suplementado con medio condicionado de macrófagosM2”.**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:  
**Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Presenta:**

L.N. Ximena Ávalos Márquez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**SINODALES**

Dra. Minerva Ramos Gómez

Presidente

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán

Secretario

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

M.C. Josué Manríquez Núñez

Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

---

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

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

Santiago de Querétaro, Qro., a febrero de 2023.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de este proyecto, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en Alimentos por los conocimientos adquiridos durante ésta maestría. Agradezco a mi directora de tesis la Dra. Minerva Ramos Gómez, así como a cada miembro de mi comité y equipo de laboratorio por haberme motivado y guiado en este proceso. A mi familia, en especial a mi papá León Gerardo, mi hermana Fernanda y a mi pareja Dilan por siempre brindarme su apoyo incondicional.

## RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), definida como la acumulación excesiva de triglicéridos en los hepatocitos, se caracteriza por la presencia de estrés oxidativo e inflamación a partir de macrófagos pro-inflamatorios o tipo M1. Por lo tanto, es relevante identificar estímulos que permitan a los macrófagos polarizarse en tipo anti-inflamatorio (M2), lo que contribuiría a controlar la progresión de EHGNA. El resveratrol (RSV) ha mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de EHGNA al modular el metabolismo de los lípidos y promover el estado redox/anti-inflamatorio; sin embargo, la contribución de los macrófagos M2 estimulados por RSV en condiciones de glucosa alta y lipopolisacárido (LPS) no se ha investigado. Por lo tanto, para evaluar el efecto del RSV (1-100  $\mu\text{M}$ ) y el medio M2 condicionado (MCM2 25, 50 y 100%) sobre la acumulación de lípidos y el estado redox se estableció un modelo de esteatosis *in vitro* verificado por análisis de microscopía, tinción de rojo oleoso y densidad óptica mediante la exposición de células HepG2 a varias concentraciones de glucosa (25, 30 y 50 mM) e insulina (10  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo glucosa 30 mM e insulina las mejores condiciones para este modelo en células HepG2 y la concentración de RSV 10  $\mu\text{M}$  la mejor condición para contrarrestar/disminuir los parámetros característicos de la enfermedad. La suplementación de macrófagos RAW 274 cultivados en glucosa alta estimulados con LPS (60 ng/mL) con RSV 10  $\mu\text{M}$  disminuyó la expresión relativa de IL-1 e IL-6, aumentando los niveles de Arg1 e IL-10 por qPCR; también se observaron menores niveles de óxido nítrico (ON), confirmando su fenotipo anti-inflamatorio M2. La adición del MCM2 disminuyó la concentración de TG, la acumulación de lípidos, los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) y ON, aumentando la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GST y la expresión relativa de IL-10. En general, estos resultados corroboran el efecto protector del resveratrol sobre la acumulación de lípidos, el estado redox y anti-inflamatorio en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática suplementado con medio condicionado de macrófagos M2, confirmando el efecto protector adicional del MCM2 en los hepatocitos esteatósicos previamente suplementados con RSV.

**Palabras clave:** Resveratrol (RSV), EHGNA, macrófagos M2, estrés oxidativo, lípidos

## ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), defined as the excessive accumulation of triglycerides in hepatocytes, is characterized by the presence of oxidative stress and inflammation from pro-inflammatory or M1-type macrophages. Therefore, it is relevant to identify stimuli that allow macrophages to polarize into the anti-inflammatory M2-type, which would contribute to controlling the progression of NAFLD. Resveratrol (RSV) has shown beneficial effects in the treatment of NAFLD by modulating lipid metabolism and promoting the redox/anti-inflammatory state; however, the contribution of RSV-stimulated M2 macrophages under high glucose and lipopolysaccharide (LPS) conditions has not been investigated. Therefore, to evaluate the effect of RSV (1-100  $\mu\text{M}$ ) and conditioned M2 medium (25, 50 and 100% MCM2) on lipid accumulation and redox status, an *in vitro* model of steatosis was established by microscopy, oily red staining, and optical density by exposing HepG2 cells to various concentrations of glucose (25, 30, and 50 mM) and insulin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), with 30 mM glucose and insulin being the best conditions for this model in HepG2 cells and the concentration of RSV 10  $\mu\text{M}$  the best condition to counteract/decrease the characteristic parameters of the disease. Supplementation of LPS (60 ng/mL)-stimulated high-glucose cultured RAW 274 macrophages with RSV 10  $\mu\text{M}$  decreased the relative expression of IL-1 and IL-6, and increased Arg1 and IL-10 mRNA levels by qPCR; lower levels of nitric oxide (NO) were also observed, confirming the anti-inflammatory M2 phenotype. The addition of MCM2 to steatotic HepG2 cells supplemented with RSV 10  $\mu\text{M}$  further decreased TG concentration, lipid accumulation, lipid peroxidation (TBARS) and NO levels, and increased the activity of the antioxidant enzymes GPx and GST and the relative expression of IL-10. Overall, these results corroborate the protective effect of RSV on lipid accumulation, redox and anti-inflammatory status in an *in vitro* model of hepatic steatosis supplemented with M2 macrophage conditioned medium, confirming the additional protective effect of MCM2 on steatotic hepatocytes previously supplemented with RSV.

**Keywords:** Resveratrol (RSV), NAFLD, M2 macrophages, oxidative stress, lipids

# ÍNDICE GENERAL

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Hígado y esteatosis hepática .....	3
2.1.1 Prevalencia.....	4
2.1.2 Patogénesis y contribución de macrófagos a la EHGNA.....	4
2.2. Estrés oxidativo, sistemas antioxidantes y terapias antioxidantes en EHGNA.....	9
2.2.1 Estrés oxidativo y peroxidación lipídica en EHGNA .....	9
2.2.2 Sistemas antioxidantes .....	10
2.2.3 Terapias antioxidantes y anti-inflamatorias en EHGNA.....	12
2.3 Efecto del resveratrol RSV en EHGNA.....	13
2.3.1 Resveratrol (trans-3,5,4-trihidroxistilbeno) .....	13
2.3.2. Mecanismos del resveratrol (RSV).....	14
2.3.3. Inducción de sistemas antioxidantes.....	14
2.3.4. Inhibición de la acumulación de lípidos .....	15
2.4. Inhibición de la inflamación y polarización de macrófagos M2 .....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. OBJETIVOS .....	20
4.1. Objetivo general .....	20
4.2. Objetivos específicos .....	20
5. METODOLOGÍA .....	21
5.1 Diagrama experimental .....	21
5.2 Cultivos celulares .....	21
5.3 Modelo de esteatosis <i>in vitro</i> .....	22
5.3.1 Medios de cultivo para hepatocitos (HepG2).....	22
5.3.2 Implementación del modelo de esteatosis <i>in vitro</i> .....	23
5.4 Células HepG2 suplementadas con RSV en modelo <i>in vitro</i> de EHGNA.....	23
5.5 Obtención de medio de condicionado de macrófagos (M2) .....	24
5.5.1 Medios de cultivo para macrófagos.....	24
5.5.2 Tratamientos en macrófagos .....	24
5.6. Células HepG2 suplementadas con MCM2 .....	25

5.7. Ensayos de viabilidad celular .....	26
5.7.1 Ensayo de MTT .....	26
5.7.2 Cuantificación de proteína total por el método de BCA .....	26
5.8. Ensayos de acumulación de lípidos.....	27
5.8.1. Análisis al microscopio.....	27
5.8.2. Ensayo de rojo oleoso .....	28
5.8.3. Determinación de triglicéridos (TG).....	28
5.9. Ensayos para determinar estado redox de las células HepG2.....	29
5.9.1. Cuantificación de la concentración de grupos tioles totales (GSH) .....	29
5.9.2. Actividad de enzima glutatión peroxidasa (GPx) .....	29
5.9.4 Ensayo de TBARS para determinar peroxidación de lípidos .....	31
5.10. Ensayos para determinar inflamación en células HepG2 y macrófagos .....	31
5.10.1. Cuantificación de nitritos por el reactivo de Griess.....	31
5.10.2. Determinación de expresión relativa de marcadores relacionados al proceso de polarización de macrófagos por qPCR (Arg1, IL-1, IL-6 e IL-10).....	32
5.11. Diseño y análisis estadístico.....	35
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
6.1. Determinación de la concentración de glucosa e insulina para el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA. ....	36
6.2. Efecto de la concentración de glucosa e insulina en la acumulación de gotas lipídicas en las células HepG2 .....	38
6.3. Efecto de la concentración de resveratrol (RSV) en la viabilidad del modelo <i>in vitro</i> de EHGNA .....	41
6.4. Efecto de la concentración de resveratrol (RSV) en la acumulación de lípidos del modelo <i>in vitro</i> de EHGNA. ....	45
6.5. Polarización de macrófagos y obtención de MCM2.....	46
6.6. Efecto de la suplementación del MCM2 sobre el RSV en la viabilidad del modelo <i>in vitro</i> de EHGNA.....	52
6.7. Efecto de la concentración del MCM2 en la acumulación de lípidos del modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con RSV.....	54
6.8. Efecto de la concentración del MCM2 sobre el estado redox del modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con RSV .....	56
6.8.1. Cuantificación de grupos tioles totales en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA .....	56
6.8.2. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA.....	58

6.8.3. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) en en modelo <i>in vitro</i> de EHGNA.....	60
6.8.4. Peroxidación lipídica a través del ensayo de TBARS en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA.....	61
6.9. Efecto de la concentración del MCM2 sobre el RSV en el nivel de inflamación del modelo <i>in vitro</i> de EHGNA .....	63
6.9.1. Marcadores de inflamación en modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con RSV y MCM2.....	63
7. CONCLUSIONES .....	66
8. REFERENCIAS .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Papel de la polarización del macrófago en la inflamación durante las enfermedades infecciosas .....	8
<b>Figura 2.</b> Diagrama experimental. ....	21
<b>Figura 3.</b> Diagrama experimental del cultivo de células HepG2 en un modelo <i>in vitro</i> de esteatosis hepática suplementado con RSV. ....	24
<b>Figura 4.</b> Diagrama experimental para la inducción de polarización de macrófagos por RSV. ....	25
<b>Figura 5.</b> Diagrama experimental del cultivo y manejo de células HepG2 en un modelo <i>in vitro</i> de esteatosis hepática suplementado con RSV y MCM2. ....	26
<b>Figura 6.</b> Efecto de la concentración de glucosa e insulina en la viabilidad (MTT) y la concentración de proteína (BCA) intracelular en las células HepG2. ....	37
<b>Figura 7.</b> Efecto de la concentración de glucosa en la acumulación de lípidos determinados mediante la densidad óptica de ensayos de rojo oleoso en células HepG2 sin (A) y con (B) 10 µg/mL de insulina. C) Cuantificación de TG totales en lisis de células HepG2 sin y con 10 µg/mL de insulina. ....	40
<b>Figura 8.</b> Imágenes de células HepG2 de ensayo de rojo oleoso con diferentes concentraciones de glucosa sin y con insulina 10 µg/mL obtenidas en un microscopio de fases (20 X). ....	41
<b>Figura 9.</b> Efecto de la concentración de RSV en un modelo <i>in vitro</i> de EHGNA en cultivos de células HepG2 sobre la viabilidad celular. ....	44
<b>Figura 10.</b> Efecto de la concentración de RSV en la acumulación de lípidos evaluados mediante la densidad óptica de ensayos de rojo oleoso en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA (A) y con el contenido de TG totales en lisis de células HepG2 en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA (B). ....	46
<b>Figura 11.</b> Polarización de macrófagos M2. ....	50
<b>Figura 12.</b> Efecto del RSV sobre la polarización de macrófagos en condiciones de alta glucosa suplementados con LPS. Expresión relativa de mRNA para genes anti-inflamatorios (A), expresión relativa de mRNA para genes pro-inflamatorios (B). ...	51
<b>Figura 13.</b> Efecto de la adición de MCM2 en la viabilidad de células HepG2 con alta glucosa (30 mM) e insulina (10 µg/mL) y suplementadas con RSV (10 µM). ....	53
<b>Figura 14.</b> Efecto de la adición de MCM2 en la concentración lipídica en las células HepG2 con alta glucosa (30 mM) e insulina (10 µg/mL) y suplementadas con RSV (10 µM). ....	55
<b>Figura 15.</b> Captura de imágenes de células HepG2 en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con RSV y MCM2 a través de un microscopio de fases (40 X). ....	56
<b>Figura 16.</b> Efecto de la concentración de MCM2 en el contenido de glutatión (GSH) total en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. ....	58
<b>Figura 17.</b> Efecto de la concentración de MCM2 en la actividad de la enzima GPX en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. ....	59
<b>Figura 18.</b> Efecto de la concentración de MCM2 en la actividad de la enzima GST en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. ....	61
<b>Figura 19.</b> Efecto de la concentración de MCM2 en los niveles de peroxidación lipídica en el modelo <i>in vitro</i> de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. ....	62

**Figura 20.** Efecto de la concentración de MCM2 en la inflamación medida con la concentración de óxido nítrico en el modelo in vitro de EHGNA suplementado con 10  $\mu$ M de RSV..... 64

## 1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que la población mexicana reúne varios factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), como la obesidad y el sobrepeso.

El curso natural de la EHGNA varía de acuerdo con la etiología y condiciones como los procesos de estrés oxidativo y la inflamación, que tiene el potencial para progresar a fibrosis y cirrosis. Su desarrollo se ha relacionado con la actividad de macrófagos que tienen un papel importante en la homeostasis inmunitaria hepática y el desarrollo de otras enfermedades hepáticas (Krenkel & Tacke, 2017). Evidencia reciente muestra que los macrófagos pueden ser reprogramados en respuesta a señales en el microambiente, lo que resulta en su heterogeneidad. Particularmente, se han reportado las funciones pro- y anti-inflamatorias de los macrófagos a través de su polarización en M1 y M2, respectivamente, en la progresión de la EHGNA. En este sentido, se ha observado la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos tipo M1 estimulados con el lipopolisacárido (LPS); mientras que, los macrófagos M2 liberan citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10). Aunado a esto, polifenoles como el resveratrol (RSV) pueden promover la polarización de macrófagos en M2 (Atri et al., 2018; Yu et al., 2019). Sin embargo, no existen estudios que reporten el efecto del RSV en la polarización de macrófagos a M2 bajo condiciones de alta glucosa y estimulados con LPS (tipo M1) que simulen las condiciones fisiológicas de la EHGNA y su contribución en el control de EHGNA.

El RSV es un compuesto polifenólico natural con diversas funciones biológicas como la participación en la modificación del metabolismo lipídico, así como el efecto protector sobre el estado redox y anti-inflamatorio en las células hepáticas. Diferentes líneas de evidencia *in vitro*, modelos animales y ensayos clínicos emergentes sustentan estos efectos beneficiosos del RSV sobre la EHGNA (Smoliga & Blanchard, 2017).

De acuerdo con estos datos, el presente estudio evaluó el efecto protector del RSV sobre la acumulación de lípidos y estado redox en las células HepG2 del modelo *in vitro* de esteatosis hepática y la contribución de la suplementación con medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2), obtenidos bajo condiciones de alta glucosa y LPS y suplementados con RSV, en los eventos o procesos celulares (viabilidad celular, lipogénesis y peroxidación lipídica), que se presentan en enfermedades como la EHGNA y que son un problema de salud nacional.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Hígado y esteatosis hepática

La EHGNA se define como acumulación excesiva de triglicéridos (TG) dentro de los hepatocitos (Idilman et al., 2016).

Ipsen y colaboradores (2018) aluden que el hígado constituye un órgano esencial en el metabolismo lipídico. Este órgano actúa como regulador central de la homeostasis lipídica, es responsable de llevar a cabo la síntesis *de novo* de ácidos grasos (AG), su exportación y posteriormente la redistribución a otros tejidos, así como su utilización como sustratos de energía.

Los niveles de lípidos intrahepáticos se rigen por el equilibrio entre la adquisición de lípidos y la eliminación para obtener una homeostasis lipídica hepática. El hígado adquiere lípidos mediante la absorción de AG circulantes y a través la lipogénesis *de novo*. Por el contrario, los lípidos se pueden eliminar por medio de la oxidación (en las mitocondrias, peroxisomas y citocromos) y la exportación como partículas de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). En consecuencia, la acumulación de lípidos es el resultado de vías de adquisición de lípidos que exceden las vías de eliminación (Ipsen et al., 2018). Estos procesos están estrechamente regulados por interacciones complejas entre hormonas, receptores nucleares y factores de transcripción, manteniendo la homeostasis lipídica hepática bajo estricto control. La interrupción de uno o más de estas vías pueden precipitar la retención de grasa dentro del hígado y el posterior desarrollo de EHGNA (Bechmann et al., 2012).

Lloren y colaboradores (2017) mencionan que la EHGNA es una patología que está íntimamente relacionada con los diferentes componentes característicos del síndrome metabólico, especialmente con la obesidad, la diabetes y la resistencia a la insulina, de manera que se considera el componente hepático de dicho síndrome.

### 2.1.1 Prevalencia

En la actualidad, la prevalencia de EHGNA es de 28-46% en los Estados Unidos y de 6-35% en el resto del mundo. Si bien, la prevalencia de esta patología en México no está del todo definida, a través de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) y su reporte de prevalencia de sobrepeso (32.4 %) y obesidad (36 %), podemos observar un incremento de este porcentaje en adultos en comparación con los datos del 2012 (sobrepeso, 28.7 % y obesidad, 32.8 %). El aumento de estas cifras es constante y, por consecuente, lo es el desarrollo predisponente de múltiples enfermedades crónicas no transmisibles como lo es la EHGNA, enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal crónica, diabetes mellitus, entre otras. Este tipo de enfermedades dan origen aproximadamente al 70 % de la tasa de mortalidad a nivel mundial, además de provocar una disminución en la calidad de vida de la población. Hoy en día, la EHGNA es la enfermedad hepática más frecuente en todo el mundo, con una tasa de prevalencia global estimada del 24-25 % (Briseño et al., 2019; ENSANUT, 2021).

La patogénesis de la EHGNA hepática es compleja y abarca diversos eventos intrahepáticos y extrahepáticos. En este sentido, diversos estudios indican que los macrófagos tienen un papel importante en la progresión y el control de esta enfermedad.

### 2.1.2 Patogénesis y contribución de macrófagos a la EHGNA

La EHGNA es una enfermedad multifactorial con una compleja fisiopatología producida por un desbalance en la síntesis y remoción de los TG en el hígado. A pesar de la estrecha relación entre la acumulación de TG y la resistencia a la insulina, existe controversia donde se cuestiona si la resistencia es responsable de la excesiva deposición de grasa en el hígado, o si el aumento en el contenido de TG es un requisito previo para el desarrollo de la resistencia a la insulina (Aguilera, 2018). En este sentido, la progresión clínica-patológica puede evolucionar de

esteatosis simple a esteatohepatitis, cirrosis y cáncer hepático, estadios de la enfermedad que son irreversibles.

Para profundizar en el desarrollo de la EHGNA, se ha reportado que la sobre nutrición produce una condición de obesidad, causando la expansión de los adipocitos, así como la acumulación de grasa ectópica. Se presenta un aumento de la lipólisis y, por lo tanto, de AG libres (AGL) en torrente sanguíneo, los cuales pueden entrar en el hígado a través de la circulación portal. Niveles elevados de AG hepáticos aumentan la síntesis de TG. En consecuencia, la lipotoxicidad hepática ocurre cuando la capacidad hepática para usar, almacenar y exportar AG como TG se ve desbordada por un flujo masivo de AG de la periferia, principalmente, del tejido adiposo, o por el aumento de lipogénesis *de novo* en el hígado, ambas características distintivas de resistencia a la insulina y EHGNA (García et al., 2011; Pardo et al., 2015; Powell et al. 2021). Los niveles de AG correlacionan con la gravedad de la enfermedad, ya que contribuyen a la inflamación sirviendo como ligandos para el TLR4 (receptor de tipo toll 4) presentes en los macrófagos o células Kupffer e induciendo la producción de citocinas, coadyuvando así, al desarrollo de la EHGNA (Manne et al., 2018).

Las citocinas son proteínas y glucoproteínas que se ven involucradas en diversos procesos biológicos, tales como en la patogénesis de la enfermedad, así como en la respuesta no específica a la infección y la progresión de los procesos degenerativos (Dinarello, 2007). Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (ILs), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN) y las quimiocinas, las cuales participan en el progreso de la EHGNA (Dayarka et al., 2007).

Los macrófagos activados secretan una serie de citocinas para reclutar y activar otras células para iniciar respuestas inmunitarias adaptativas (Aderem et al., 2000). Tras el reconocimiento de lipopolisacáridos (LPS) por los TLR4 y su posterior activación, los macrófagos sintetizan y secretan primero una secuencia temporal de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF como citocina de respuesta temprana,

e IL-1 y IL-6, que se secretan en un marco de tiempo superpuesto (Bopst et al., 1998). Posteriormente, se secretan mediadores anti-inflamatorios como las IL-10 e IL-4, los cuales están destinados a regular negativamente la liberación de citocinas pro-inflamatorias y delimitan generalmente la respuesta inflamatoria.

Dinarello (2011) ha reportado funciones características de algunas ILs como la IL-1, la cual actúa principalmente de forma intracelular. La familia de IL-1 de ligandos y receptores se asocia principalmente a la presencia de inflamación crónica. Una característica de esta familia es que contienen el dominio del receptor Toll-IL1, por lo que las respuestas a este grupo de IL-1 son fundamentales para la inmunidad innata. De igual manera, la IL-6 interviene regulando la respuesta inmunológica, en la hematopoyesis y en las reacciones de fase aguda, produciendo también efectos pro-inflamatorios (Heinrich., 2003; Dinarello., 2011).

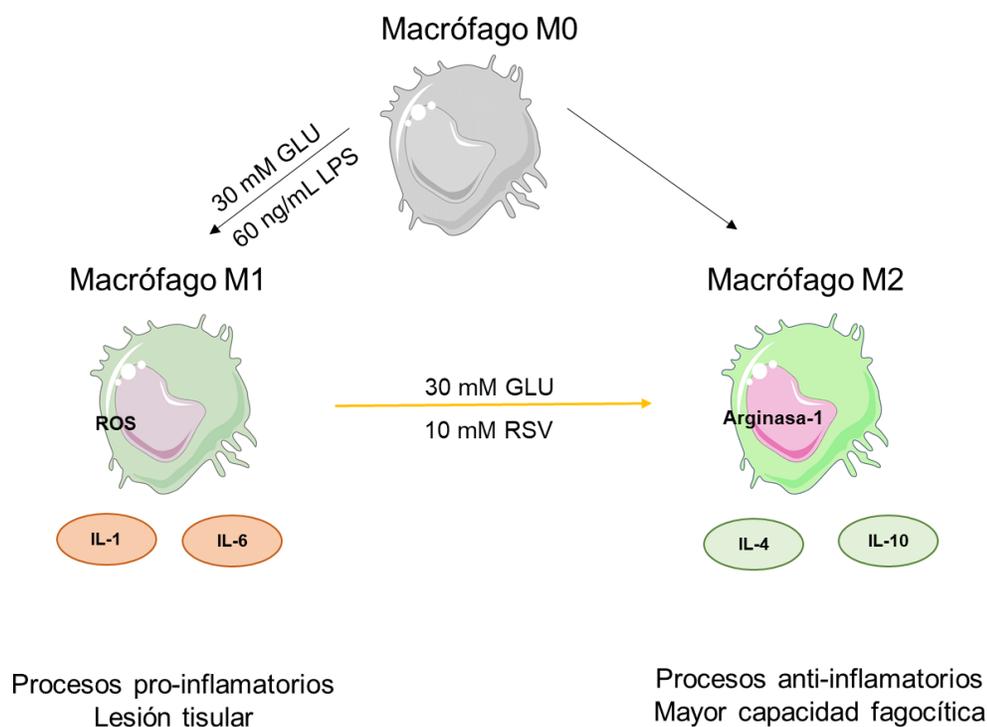
Respecto a la IL-4, ésta tiene su origen en los linfocitos T activados y promueve la inducción, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Esta citocina interviene de forma decisiva en la inducción de las células Th2 que regulan la inmunidad humoral, teniendo una función antiinflamatoria (Fiella et al., 2002). Finalmente, IL-10 es considerada la citocina más importante en cuanto a la supresión de las respuestas pro-inflamatorias en enfermedades autoinmunes, limitando las respuestas inmunitarias excesivas. También, IL-10 han mostrado capacidad funcional en la regulación inmunitaria, la homeostasis tisular y la defensa del huésped (Wei et al., 2019).

Adicionalmente, se debe considerar que en esta condición inflamatoria de EHGNA, la producción de óxido nítrico (ON) en el hígado es un parámetro que se encuentra alterado, debido al estrés que presenta el cuadro patológico. El ON producido por los macrófagos o células Kupffer actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. En este sentido, el ON tiene la capacidad de oxidar los grupos sulfhidrilos de las proteínas provocando el agotamiento del glutatión (GSH) citosólico y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno, el cual resulta ser fuertemente

oxidante y un radical hidroxilo muy reactivo. El ON se ha involucrado en diversas enfermedades inflamatorias como lo es la EHGNA (Pérez et al., 1997; Korhonen et al., 2005).

Con base a la información anterior, los macrófagos se han clasificado principalmente por sus funciones en M1 (macrófagos activados clásicamente) y M2 (macrófagos activados alternativamente) (Figura 1). Los macrófagos de tipo M1 liberan elementos pro-inflamatorios como las citocinas IL-1 e IL-6, entre otras. En contraparte, los M2 liberan elementos anti-inflamatorios como son la IL-4 e IL-10, que coadyuvan a promover la homeostasis de los diversos tejidos del organismo (Yu et al., 2019; Li et al., 2020; Wang et al., 2020).

El desarrollo de EHGNA se ha relacionado a un incremento de macrófagos M1 en tejido hepático (Valenzuela et al., 2014); no obstante, los estímulos que promueven la acumulación de los mismos no están del todo esclarecidos. Esto es relevante, ya que los macrófagos se caracterizan por una plasticidad y versatilidad notables, cambiando de un fenotipo a otro. Este fenómeno es el resultado de los macrófagos que responden a los estímulos micro ambientales locales encontrados en diferentes tejidos y activan diversas cascadas de señalización. En diferentes tipos y etapas de enfermedades hepáticas, los macrófagos se encuentran críticamente involucrados en la progresión y regresión debido a una estrecha comunicación con otras células en el hígado (Da Rocha et al., 2014; Chen et al., 2020). En este sentido, dependiendo del estímulo predominante, se favorece que este represor limite la acción de uno u otro factor de transcripción promoviendo a lo que se conoce como el fenómeno de polarización. Es de especial interés la identificación de estímulos que permitan la polarización a macrófagos de tipo M2, los cuales en principio contribuirían a disminuir la progresión de EHGNA.



**Figura 1.** Papel de la polarización del macrófago en la inflamación durante las enfermedades infecciosas. (Adaptado de Atri et al., 2018).

Suurmond y colaboradores (2019) llevaron a cabo un modelo hepático *in vitro* aplicando un medio condicionado de macrófagos. Se demostró que la activación de las células Kupffer (a M1) se asocian con cambios morfológicos, secreción de citocinas pro-inflamatorias, así como mayores niveles de estrés celular. Con estas alteraciones se contruyó un mejor modelo hepático humano *in vitro* de EHGNA. El modelo hepático propuesto en el estudio sugiere que es una alternativa viable para imitar la condición de EHGNA y, así, poder monitorear los procesos inflamatorios y de apoptosis celular que se presentan.

## 2.2. Estrés oxidativo, sistemas antioxidantes y terapias antioxidantes en EHGNA

### 2.2.1 Estrés oxidativo y peroxidación lipídica en EHGNA

El fenómeno de estrés oxidativo constituye un desequilibrio de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y producción de antioxidantes, siendo este desequilibrio a favor de los pro-oxidantes; condición que puede repercutir en eventos fisiopatológicos a nivel hepático. Las EROs pueden dañar en forma directa, alterando biomoléculas esenciales, con la consiguiente pérdida de su función biológica y viabilidad celular, o bien indirectamente, por activación en las células Kupffer y de factores de transcripción redox-sensibles, como NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), los que a su vez promueven la síntesis de mediadores pro-inflamatorios, citotóxicos y fibrogénicos (Kaplowitz, 2000; Tilg & DiahI, 2000).

El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la iniciación y progresión de EHGNA. Estudios clínicos mostraron un elevado nivel de estrés oxidativo y peroxidación lipídica en pacientes con EHGNA (Svegliati et al., 2019; Chen et al., 2020). Una de las consecuencias clave del estrés oxidativo incontrolado es un daño directo a los lípidos, particularmente a los AG poliinsaturados, causando peroxidación lipídica y la formación de aldehídos, productos altamente reactivos como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). Es importante destacar que estos compuestos reactivos tienen vidas medias más largas que los radicales libres y pueden difundir en el espacio extracelular y aumentar el daño tisular (Rada et al., 2020).

En un estudio *in vitro* con hepatocitos primarios aislados de ratones se demostró que una concentración alta en sacarosa genera un aumento de los AG saturados hepáticos, derivados de la lipogénesis *de novo* acelerada, y promueve el estrés en el retículo endoplásmico. En EHGNA, esta acumulación de lípidos es considerada una condición de principal atención, ya que esta puede ser revertida a través de

terapia antioxidante y evitar la progresión de la enfermedad (Kim et al., 2010; Pfaffenbach et al., 2010).

Las características funcionales de las células HepG2 se han estudiado ampliamente, debido a que expresan diversas funciones hepáticas diferenciadas, como la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, el colesterol y metabolismo de TG, el metabolismo y transporte de lipoproteínas, la síntesis de ácido biliar, la síntesis de glucógenos, o señalización de insulina, siendo así una línea celular de interés en las enfermedades donde se ven alteradas las funciones hepáticas (Donato et al., 2015). Se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa (25 – 33 mM) en las células HepG2 inducen estrés metabólico, estrés oxidativo y mitocondrial, acompañado de inflamación que se puede asociar a las complicaciones propias de la EHGNA. Lo anterior se ha asociado a la acumulación de lípidos y un metabolismo alterado de lipoproteínas a través de la activación de genes lipogénicos, así como a la oxidación de lípidos, proteínas y daño al DNA (Gorgani & Reza, 2005; Palmeira et al., 2007; Alnahdi et al., 2019).

Masarone y colaboradores (2018) puntualizan que el estrés oxidativo actúa como el factor más importante en todos los impactos biológicos capaces de determinar el desarrollo y agravamiento del panorama de la EHGNA. Sin embargo, las EROs y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) producidas en procesos de estrés oxidativo y otros procesos metabólicos son neutralizados por sistemas enzimáticos, sobresaliendo la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión S-transferasa (GST); no enzimáticos como el glutatión (GSH) y por defensas celulares vitamínicas, principalmente las vitaminas E y C, además de compuestos como el RSV presentes en los alimentos.

### 2.2.2 Sistemas antioxidantes

Diversas líneas de estudios indican una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes como la GPx y GST, así como del antioxidante no enzimático GSH en EHGNA (Hajighasem et al., 2018).

Debido a que varios antioxidantes pueden influir favorablemente en el entorno redox celular y, en consecuencia, en los mecanismos moleculares implicados en la EHGNA, el uso de tales compuestos puede ser beneficioso en el tratamiento de esta patología, ya que el desequilibrio redox juega un papel importante en su patogénesis temprana, previa resistencia a la insulina y alteraciones del metabolismo lipídico (Serviddio et al., 2010).

Para garantizar la integridad de la membrana y minimizar el daño causado por EROs, la enzima GPx convierte los hidroperóxidos lipídicos (R-OOH) en alcoholes lipídicos (R-OH) utilizando GSH como cofactor (Tian et al., 2021). En general, la enzima GPx es una enzima dependiente de selenio (Se) que tiene una doble función en la homeostasis celular como guardián contra el daño oxidativo, así como un regulador fisiológico en la generación de EROs (Forcina et al., 2019).

En un estudio *in vivo*, los autores demuestran que el aumento de la actividad de la enzima GPx suprime la inflamación mediada por la vía de NF- $\kappa$ B, así como la reducción de las EROs intracelulares y, en consecuencia, la supresión de esta muerte celular. Por lo que, los autores concluyen que la GPx juega un papel clave en la peroxidación lipídica relacionada con EHGNA y la muerte celular asociada.

El GSH es un tripéptido antioxidante no enzimático que tiene un papel importante en el proceso de estrés oxidativo, sirve como cofactor o donante de hidrógeno a enzimas antioxidantes, entre ellas la GPx y la GST. GST se encarga de catalizar la conjugación de GSH con sustancias electrofílicas producidas de manera endógena, tales como los aldehídos producidos durante la peroxidación de lípidos, teniendo actividad inhibitoria importante de hidroperóxidos orgánicos y xenobióticos. El incremento en la actividad de estas enzimas evita el agravamiento del estrés oxidativo en el hígado de pacientes con EHGNA (Cisneros et al., 2011).

Irie y colaboradores (2016) encontraron una disminución significativa en el nivel sérico de GSH en pacientes con EHGNA; mientras que, el marcador de la oxidación del ADN, 8-hidroxi-2-deoxyguanosina (8-OHdG), se incrementó significativamente.

Sharma y colaboradores (2017) añaden que el GSH desempeña un papel importante destruyendo los intermediarios de EROs. Una de las funciones principales del GSH es el mantenimiento del balance redox en la célula, así como su protección contra los reactivos electrofílicos. Por otro lado, Kumar y colaboradores (2013) demostraron que pacientes con EHGNA presentan un bajo nivel de GSH y una menor actividad de CAT en el hígado; mientras que, el contenido de MDA se incrementó significativamente en el hígado.

La disminución de los niveles de ciertos antioxidantes puede ser la razón principal para la progresión de la EHGNA. En este sentido, la administración de algunos antioxidantes como el RSV, la vitamina E, la L-carnitina, la pentoxifylina y el ácido lipoico tienen efectos preventivos y terapéuticos sobre la esteatosis hepática al modular los niveles de los antioxidantes y disminuir la lipogénesis y estrés oxidativo (Hajighasem et al., 2018).

La investigación referente a las propiedades nutracéuticas de diferentes compuestos vegetales en la dieta es relevante para obtener información sobre la modulación de los mecanismos sobre los que podrían estar actuando, contribuyendo al diseño de nuevas estrategias y/o productos destinados al tratamiento de la EHGNA. Los compuestos como el RSV se proponen por su capacidad de activar una respuesta antioxidante a nivel celular en macrófagos y hepatocitos al suprimir la actividad de NF- $\kappa$ B y la activación Nrf2 [factor nuclear eritroide-2 (NF-E2)], respectivamente (Yu et al., 2019; Li et al., 2020).

### 2.2.3 Terapias antioxidantes y anti-inflamatorias en EHGNA

Los compuestos antioxidantes y anti-inflamatorios que modulan la lipogénesis, la oxidación lipídica, la peroxidación e inflamación, actualmente representan un nuevo enfoque terapéutico atractivo para los pacientes que presentan esteatosis hepática.

Núñez (2011) refieren que el término terapia antioxidante se relaciona con la administración de formulaciones que contengan productos antioxidantes, sea esta de forma única o complementaria, en la terapia de una enfermedad específica. Uno

de los factores que puede contribuir a ello es el entorno regulador donde los antioxidantes no se consideran medicamentos, sino suplementos nutricionales o productos naturales para la salud.

Zelber-Sagui y colaboradores (2011) refieren que tanto factores genéticos como ambientales y, especialmente, hábitos dietéticos, se han implicado en la modulación de la compleja red de señales moleculares que conduce a la EHGNA. La modificación del estilo de vida es eficaz en el tratamiento de esteatosis hepática y la inflamación. Sin embargo, como la mayoría de los pacientes no cumplen con una dieta saludable y actividad física, se han propuesto varios medicamentos para el tratamiento de EHGNA, pero ninguno ha demostrado una eficacia considerable en todo el espectro de daño hepático.

Los polifenoles naturales se han caracterizado históricamente por sus potentes propiedades antioxidantes. Varias líneas de evidencia *in vitro*, modelos animales y ensayos clínicos emergentes informaron efectos beneficiosos sobre la EHGNA y vías moleculares relacionadas. En el entorno preclínico como clínico se ha mostrado el poder antioxidante y anti-inflamatorio del RSV (Zelber et al., 2011).

## 2.3 Efecto del resveratrol RSV en EHGNA

### 2.3.1 Resveratrol (trans-3,5,4-trihidroxistilbeno)

El RSV es un compuesto polifenólico que se encuentra naturalmente en varias plantas, incluyendo uvas, bayas y cacahuets, en respuesta al estrés y como mecanismo de defensa contra los hongos, virales, bacterianos infecciones y daños causados por la exposición a la radiación UV (Gómez, 2012).

Después de la publicación de un estudio en el año 2006, donde se demostraba que el RSV mejoró la salud y la supervivencia en ratones obesos, el RSV se convirtió en una molécula de interés para la industria farmacéutica y de suplementos dietéticos. Desafortunadamente no existe un consenso sobre la dosis ideal para el consumo

humano, causando una serie de limitaciones en el desarrollo de aplicaciones clínicas para el RSV (Smoliga & Blanchard, 2017).

### 2.3.2. Mecanismos del resveratrol (RSV)

#### 2.3.3. Inducción de sistemas antioxidantes

Debido al papel vital del estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades hepáticas, se proponen compuestos antioxidantes como el RSV para su prevención y tratamiento.

Una serie de estudios han comprobado la eficacia del RSV en el tratamiento de pacientes con diversas enfermedades hepáticas, como la infección crónica por el virus de la hepatitis C, la hepatitis alcohólica, la cirrosis y EHGNA (Lirussi et al., 2007; Li et al., 2014). En un ensayo clínico se evaluó el efecto de los suplementos antioxidantes, encontrándose que la enzima AST, cuyo nivel elevado se considera un indicador de daño hepático, se redujo significativamente en pacientes con EHGNA por intervención de compuestos polifenólicos como el RSV (Lirussi et al., 2007).

Xia y colaboradores (2017) refieren que el tratamiento con RSV aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPX en ratas con estrés oxidativo inducido con catecolaminas. Además, la suplementación con RSV también incrementa la expresión de Nrf2, lo que a su vez mejora de la expresión de varias enzimas antioxidantes y suprime la producción de NADPH inducida por el estrés oxidativo.

De manera similar, la suplementación de RSV (10  $\mu$ M) a las células HepG2 inhibió la producción de EROs inducidas por la alta concentración de glucosa y promovió la expresión coordinada de genes antioxidantes controlados por Nrf2 (Hosseini et al., 2020).

Existe la posibilidad de que controlando o neutralizando el estrés oxidativo se inactiven las vías que promueven la acumulación de lípidos.

#### 2.3.4. Inhibición de la acumulación de lípidos

Un gran número de funciones biológicas se han atribuido al RSV; por ejemplo, en un estudio clínico el consumo de 300 µg/kg/día de RSV a pacientes que presentaban sobrepeso y obesidad favoreció para disminuir el tejido adiposo corporal y dirigir la utilización de AG para el metabolismo celular, mejorando así los perfiles de AG en enfermedades metabólicas como lo es la EHGNA (Quiñones et al., 2012). Además, a través de un estudio *in vivo* con ratas Zucker con una dieta alta en lípidos y fructosa, provocando con ello un perfil obesogénico, se demostró que la suplementación con RSV como tratamiento modificó de manera positiva el metabolismo y producción de TG en el tejido adiposo y el hígado (Gómez et al., 2012).

Diversos estudios empleando modelos *in vitro* de EHGNA han abordado la acción hepatoprotectora del RSV, observándose que previene la acumulación de lípidos inducida por el ácido palmítico y niveles elevados de glucosa en los hepatocitos AML12 y HepG2. (Shang et al., 2008; Gnoni, 2009; Alberdi et al., 2013; Cheng et al., 2019; Malik et al., 2019; Hosseini et al., 2020; Trepiana et al., 2020).

Adicionalmente, Koushki y colaboradores (2020) a través de un estudio *in vivo* con ratones C57BL/6J y complementario un estudio *in vitro* con células HepG2 mencionan el efecto del RSV en el metabolismo lipídico, demostrando una condición benéfica sobre la EHGNA por la disminución de la adipogénesis y la lipogénesis, el aumento de la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación de los AG mitocondriales. De manera similar, los efectos terapéuticos del RSV sobre la esteatosis hepática en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas se han asociado principalmente a la inhibición de la lipogénesis *de novo* y un aumento de la oxidación de AG, evaluadas mediante la expresión de las enzimas y los transportadores implicados en el metabolismo de los TG (Shang et al., 2008; Gnoni, 2009; Alberdi et al., 2013; Cheng et al., 2019; Malik et al., 2019; Hosseini et al., 2020; Trepiana et al., 2020).

Por su parte, Yu y colaboradores (2019) explican a través del fenómeno de polarización que el oleato induce la acumulación de AG totales y TG en macrófagos, adaptando un fenotipo M1 con carácter pro inflamatorio y que estos disminuyen con el tratamiento con RSV e incluso presentan una condición similar al macrófago sin oleato (fenotipo anti inflamatorio). Dentro de los mecanismos reportados se encuentra la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y delta (PPAR $\delta$ , por sus siglas en inglés) atenuando la acumulación total de AG y TG inducida por oleato.

#### 2.4. Inhibición de la inflamación y polarización de macrófagos M2

Diversos estudios proporcionan información sobre la función anti-inflamatoria del RSV. Este compuesto ejerce sus efectos en múltiples niveles en una relación dosis-efecto. Por ejemplo, a nivel membranal, el RSV inhibe la expresión de los receptores TLR4, RAGE (receptor para productos finales de glicación avanzada) y gen MyD88 (proteína de reconocimiento temprano de patógenos) en macrófagos activados con lipopolisacáridos (LPS) con medio estándar de glucosa, lo que se asocia principalmente con la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Esto, a su vez, reduce la expresión de las citocinas pro-inflamatorias inducidas por NF- $\kappa$ B (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , entre otras) y la formación de ERNs y EROs. Estos resultados se han confirmado en los macrófagos RAW 264.7 estimuladas con LPS, así como en macrófagos aislados de ratones C57BL/6 y BALB/c (Qureshi et al, 2012; Ohtsu et al., 2017; Wang et al., 2020; Saleh et al., 2021). Aunado a lo anterior, la suplementación de RSV aumenta los niveles de marcadores M2 (Arg1, CD163, IL-4 e IL-10) (Li et al., 2020; Semnani et al., 2021), confirmando que el RSV suprime la inflamación mediante la modulación de los fenotipos polarizados de los macrófagos. Sin embargo, estos estudios se realizaron bajo condiciones de glucosa estándar; por lo anterior, resulta de interés evaluar el efecto del RSV sobre la polarización de los macrófagos M2 bajo condiciones de alta glucosa y LPS, y su contribución sobre el control de la EHGNA.

Estudios *in vivo* reportan que el RSV disminuye los depósitos de lípidos en el hepatocito y la inflamación en modelos inducidos a EHGNA. Sin embargo, la administración de 100 µg/kg de RSV en ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasas durante ocho semanas no conduce a un estado anti-inflamatorio significativo. Estas conclusiones contradictorias pueden deberse al empleo de diferentes dosis, al modelo de roedores implementado y la duración de la administración de RSV (Zhang et al., 2015). Pan y colaboradores (2015) añaden que es importante determinar los mecanismos y condiciones bajo los cuales el RSV ejerce su efecto protector contra el desarrollo de EHGNA.

Faghihzadeh y colaboradores (2014) indican que la suplementación con RSV de 500 mg por 12 semanas actúa de manera positiva sobre marcadores inflamatorios en pacientes con EHGNA. Así mismo, en una revisión sistemática se investigó la asociación de sCD163 (receptor captador de alta afinidad para el complejo hemoglobina-haptoglobina soluble), un nuevo biomarcador de activación de macrófagos, con un aumento de la resistencia a la insulina; mientras que, la suplementación con RSV redujo significativamente los niveles de sCD163 circulante en pacientes con EHGNA (Semnani et al., 2021).

En general, los estudios realizados para identificar las propiedades anti-inflamatorias de fitoquímicos como el RSV, se han enfocado, por un lado, en la disminución de citocinas pro-inflamatorias para el control de la EHGNA y su asociación con los mecanismos de polarización de macrófagos bajo condiciones de glucosa estándar y estimulados con LPS. Por otro lado, diversos estudios se han enfocado en las propiedades antioxidantes, particularmente en el control del estado redox y la normalización de los sistemas antioxidantes, además del control de la acumulación de lípidos característica de la EHGNA. Sin embargo, pocos estudios integran ambos mecanismos. En este sentido, Yu y colaboradores (2019), a través de un estudio con ratones BALB/c con una dieta alta en fructosa obteniendo un modelo *in vivo* de EHGNA, posteriormente suplementados con 400 mg/kg/día de RSV, observaron una disminución significativa de la inflamación y la acumulación

de lípidos en los ratones; posteriormente, se cosecharon los hepatocitos y, de modo *in vitro*, se co-cultivaron con macrófagos M2 (suplementados con 30  $\mu$ M de RSV, bajo condiciones de glucosa estándar), obteniendo una disminución adicional de estos parámetros.

Esto hace que el RSV sea una opción terapéutica prometedora para el tratamiento eficaz de EHGNA.

Si bien, se sabe que los macrófagos polarizados M2 poseen componentes que promueven efectos anti-inflamatorios en la condición de EHGNA; sin embargo,, no existen reportes de modelos *in vitro* de EHGNA suficientes que avalen esta característica bajo condiciones de alta glucosa y estimulados con LPS; por lo que en este proyecto se estableció como objetivo indagar en su efecto protector en esta enfermedad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En años recientes se ha propuesto un vínculo entre la progresión de los procesos inflamatorios y el desarrollo de diferentes condiciones como la obesidad, sobrepeso e hígado graso no alcohólico (EHGNA). En este sentido, se ha puesto especial atención en los macrófagos residentes en los diferentes tejidos, debido a que se identifican como los principales orquestadores de dichos procesos.

El desarrollo de patologías como la EHGNA se ha relacionado a un incremento de macrófagos M1 en el hígado, los cuales liberan elementos pro-inflamatorios como las citocinas IL-1 e IL-6, que promueven a su vez eventos pro-inflamatorios en los hepatocitos y favorecen la acumulación de lípidos. Por lo anterior, es de especial interés la identificación de la suplementación necesaria de RSV para crear estímulos que permitan la polarización a macrófagos de tipo M2 bajo condiciones de alta glucosa y estimulados con LPS, los cuales en principio contribuirían a disminuir la progresión de EHGNA por medio de su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, así como su contribución a la disminución de contenido lipídico en los hepatocitos.

Dentro del proyecto se planteó como objetivo evaluar el papel de un medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2), obtenido a partir de condiciones de cultivo con alta glucosa y estimulados con LPS, en la respuesta protectora de compuestos puros presentes en alimentos, como el RSV.

Por lo anterior, resulta de interés el estudio del fenómeno derivado de la polarización a macrófagos tipo M2 inducido por RSV bajo condiciones de alta glucosa y estimulados con LPS en un modelo de esteatosis *in vitro*, y su asociación con una menor capacidad de acumulación de lípidos y mayores niveles de sistemas antioxidantes en los hepatocitos, lo que contribuirá a disminuir o controlar los eventos celulares que prevalecen en las enfermedades metabólicas como la EHGNA.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto protector del resveratrol sobre la acumulación de lípidos y el estado redox en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática suplementado con medio condicionado de macrófagos M2.

### 4.2. Objetivos específicos

Evaluar el efecto del resveratrol sobre la viabilidad celular y la acumulación de lípidos en células HepG2 suplementadas con alta concentración de glucosa e insulina.

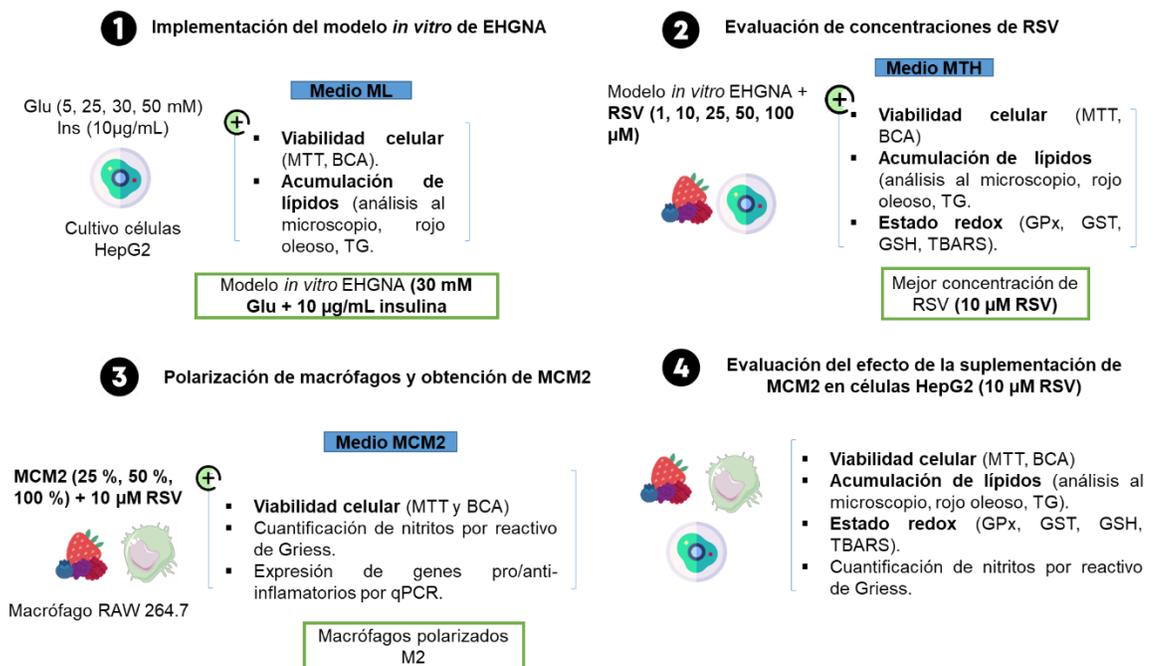
Promover la polarización de macrófagos M2 mediante la suplementación con resveratrol bajo condiciones de alta glucosa y estimulados con LPS.

Evaluar el efecto del resveratrol sobre la viabilidad celular y la acumulación de lípidos en células HepG2 suplementadas con alta concentración de glucosa e insulina y suplementadas con medio condicionado de macrófagos M2.

Determinar el efecto del resveratrol en el estado redox de células HepG2 cultivadas con alta concentración de glucosa e insulina y suplementadas con medio condicionado de macrófagos M2.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Diagrama experimental



**Figura 2.** Diagrama experimental. Ensayo MTT (MTT), glucosa (Glu), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST), glutatión total (GSH), insulina (Ins), medio condicionado obtenido de macrófagos M2 (MCM2), medio condicionado de medio de acumulación de lípidos (ML), medio de tratamiento (MTH), proteína total por el método del ácido bicinconínico (BCA), resveratrol (RVS), especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), triglicéridos (TG).

### 5.2 Cultivos celulares

Se empleó la línea celular de hepatoma humano (HepG2; *American Type Culture Collection-ATCC*, Rockville, MD, US), la cual fue donada por la Dra. Nuria E. Rocha Guzmán, del Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, TecNM/I.T. Durango. Así mismo, se empleó la línea celular de macrófagos RAW 264.7 de ratón (*American Type Culture Collection-ATCC*, Rockville, MD, US). Ambas células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma®, Merck

KGaA, DE) con glucosa estándar (5 mmol/L; Sigma®, Merck KgaA, DE) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco®, US) y 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomina, Sigma®); los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Para cosechar las células, se agregó una solución de verseno al 0.01 %, se incubó por 30 s y se retiró el verseno. En seguida, se añadió tripsina-EDTA al 0.05 % (1 X; Sigma®) estéril y se incubó a 37 °C durante 8 min. Después, se agregó medio de cultivo con 10 % de SFB para neutralizar la tripsina. Posteriormente, se tomaron células de la resuspensión para el conteo celular y se sembró el número de células acorde a las diferentes técnicas. El mantenimiento y las transferencias se realizaron en base a los protocolos de la ATCC con modificaciones ya establecidas en el Laboratorio de Estrés oxidativo y salud de la Facultad de Química.

### 5.3 Modelo de esteatosis *in vitro*

#### 5.3.1 Medios de cultivo para hepatocitos (HepG2)

- Medio estándar (ME): Medio DMEM (con glucosa estándar 5 Mm) suplementado con 10 % de SFB y 1 % de penicilina-estreptomina.
- Medio de acumulación de lípidos (ML): Medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de penicilina-estreptomina, glucosa (25, 30 y 50 mM; Sigma®, Merck KgaA, DE) sin y con 10 µg/mL de insulina (Ins, Pisa, EC) (Trepiana et al., 2020).
- Medio de tratamiento (MTH): Medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de penicilina-estreptomina, glucosa (25, 30 y 50 mM; Sigma®, Merck KgaA, DE) sin y con 10 µg/mL de insulina y diferentes concentraciones de RSV (Sigma®, Merck KgaA, DE) (Trepiana et al., 2020).
- Medio de tratamiento con medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2): Medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de penicilina-

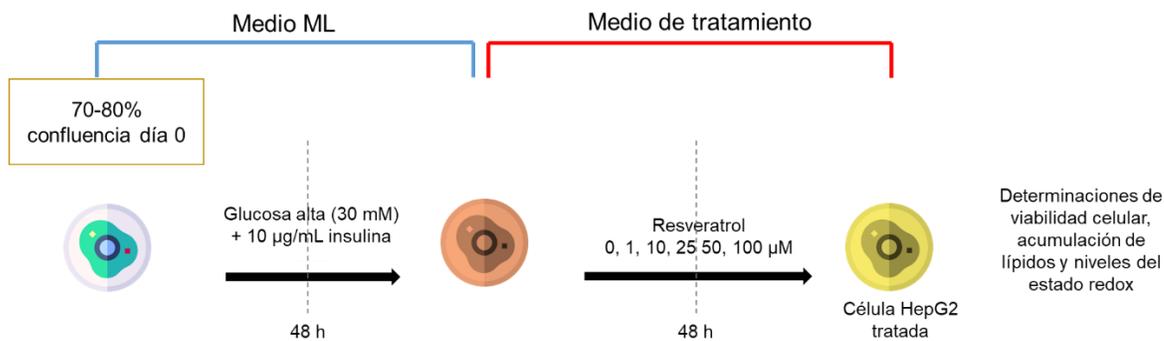
estreptomocina, 30 mM de glucosa (Sigma®, Merck KgaA, DE) y 10 µM de RSV (Sigma®, Merck KgaA, DE).

### 5.3.2 Implementación del modelo de esteatosis *in vitro*

Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  en placas de 60 mm en medio ML, hasta alcanzar una confluencia de 70-80 %. Para confirmar las condiciones adecuadas para el modelo de esteatosis *in vitro* (baja toxicidad, gotas lipídicas microvacuolares y máximos niveles de TG) se realizaron estudios de viabilidad [bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)], contenido de proteína total [método del ácido bicinonínico (BCA)] y acumulación de lípidos (tinción de rojo oleoso, TG y análisis al microscopio); cada experimento con un tiempo de incubación de 48 h (Trepiana et al., 2020). Se tomó como control los hepatocitos suplementados con glucosa estándar (5 mmol/L) y cada experimento se realizó por triplicado.

### 5.4 Células HepG2 suplementadas con RSV en modelo *in vitro* de EHGNA

Una vez establecido el modelo y posterior a las 48 h con ML, se cambió el medio de cultivo por medio MTH durante la noche y se suplementó con RSV (0, 1, 10, 25, 50 y 100 µM; Sigma®), disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®) durante 48 h, procurando que la concentración máxima de DMSO en el medio fuera de 0.01% v/v para minimizar los efectos del solvente sobre la viabilidad celular (Shang et al., 2008; Jin et al., 2013). Las concentraciones seleccionadas se tomaron de estudios previamente publicados. Es importante añadir que la dosis más baja de resveratrol (1 µM) es similar a la concentración máxima en sangre después de la administración oral de resveratrol a diferentes dosis (Trepiana et al., 2020). Cada experimento se realizó al menos tres veces y al final se procedió a las determinaciones de viabilidad celular, acumulación de lípidos y niveles del estado redox (GHS, GPx, GST y MDA (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama experimental del cultivo de células HepG2 en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática suplementado con RSV.

## 5.5 Obtención de medio de condicionado de macrófagos (M2)

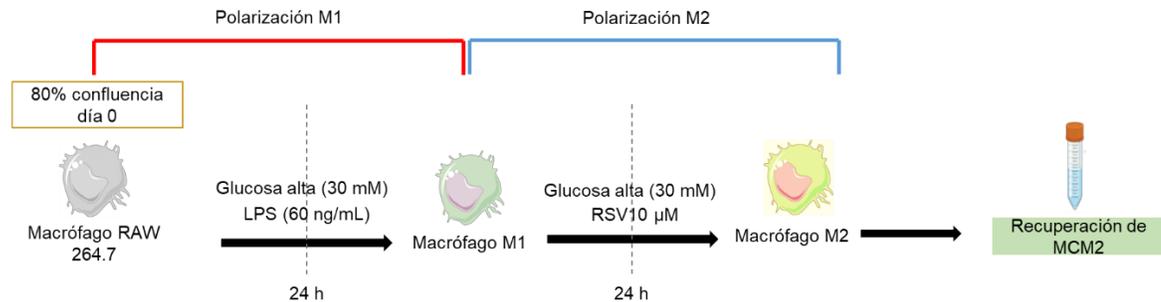
### 5.5.1 Medios de cultivo para macrófagos

- Medio estándar (ME): Medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y 1 % de penicilina-estreptomina.
- Medio de activación (MA): Medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de penicilina-estreptomina, alta glucosa y 60 ng/mL de LPS.
- Medio condicionado M2 (MTM): Medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de penicilina-estreptomina, alta glucosa, 10 µM de RSV y 60 ng/mL de LPS, con base a las condiciones establecidas en el modelo *in vitro*.

### 5.5.2 Tratamientos en macrófagos

Los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron a una densidad de  $5 \times 10^5$  en medio MA hasta alcanzar una confluencia de 70-80%. Para la polarización a M2, los macrófagos se cultivaron en medio con MTM, es decir, medio suplementado con alta glucosa, 60 ng/mL de LPS y 10 µM de RSV por 24 h (Figura 4). Con base a las condiciones establecidas en el punto 5.4 en el modelo *in vitro* suplementado con RSV. Una vez transcurridas las 24 h, se recolectó el medio en un tubo falcon de 15 mL. Se procedió también a las determinaciones de viabilidad celular (MTT y BCA), así como la expresión relativa de marcadores anti-inflamatorios (Arg1 e IL-10) y pro-

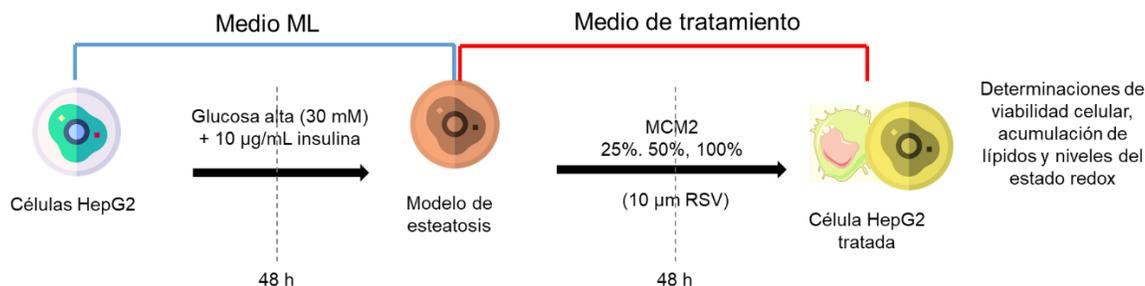
inflamatorios (IL-1 e IL-6) en macrófagos RAW 264.7 cultivados en medio suplementado con alta glucosa, 60 ng/mL de LPS y 10  $\mu$ M de RSV por qPCR.



**Figura 4.** Diagrama experimental para la inducción de polarización de macrófagos por RSV. Lipopolisacárido (LPS), medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2), resveratrol (RSV).

#### 5.6. Células HepG2 suplementadas con MCM2

Posterior a la confirmación del modelo de esteatosis, se retiró el medio de cultivo MTH (medio suplementado con alta glucosa, 10  $\mu$ g/mL de insulina y 10  $\mu$ M de RSV) y se cambió por el medio MCM2. Las células se incubaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera controlada al 5% de CO<sub>2</sub>. Se tomó como control los hepatocitos suplementados con ML (medio suplementado con alta glucosa y 10  $\mu$ g/MI de insulina) y se comparó con los hepatocitos suplementados con RSV. Al finalizar los tratamientos se procedió a las determinaciones de viabilidad celular, acumulación de lípidos y niveles del estado redox (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama experimental del cultivo y manejo de células HepG2 en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática suplementado con RSV y MCM2. Medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2), resveratrol (RSV).

## 5.7. Ensayos de viabilidad celular

### 5.7.1 Ensayo de MTT

Para descartar aquellas condiciones que muestren un efecto citotóxico, se empleó la prueba de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica de esta molécula por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (interviene en el ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones), formando un compuesto llamado formazán (azul oscuro). Por lo que, la cantidad de células viables es proporcional a la formación de formazán.

A continuación, se describe brevemente el ensayo: al término de los tratamientos se removió el medio de cultivo y se agregaron 20 µL de la solución de MTT (5 mg/mL) a cada pozo sembrado de una placa de 96, la cual se incubó a 37 °C durante 30 min. El medio de cultivo se retiró con mucho cuidado y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales de formazán. La lectura de la absorbancia se midió a 570 nm (Mosmann, 1983; Kumar et al., 2018). El porcentaje de viabilidad se expresó con respecto al control sin tratamiento.

### 5.7.2 Cuantificación de proteína total por el método de BCA

La cuantificación de proteína se realizó mediante el kit comercial BCA protein (Thermo Fisher™, US), basado en el método establecido por Smith (1985), donde el  $\text{Cu}^{+2}$  adicionado en solución de trabajo es reducido a  $\text{Cu}^{+1}$  por algunos aminoácidos

presentes en las proteínas y, posteriormente, éste interactúa con el ácido bicinonínico (BCA, por sus siglas en inglés) formando un compuesto púrpura detectable a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de proteína se correlaciona con el contenido celular y este parámetro funciona como normalizador de la viabilidad e indicador indirecto de la densidad celular.

Para lo anterior, los hepatocitos se sembraron en placa de 96 pozos a una concentración de  $5 \times 10^4$  células por pozo y se incubaron durante 48 h; al terminar se retiraron los tratamientos y se procedió a lisar las células por choque térmico con ayuda de PBS (solución salina tamponada con fosfatos) (50  $\mu$ L por pozo). Se adicionó la solución de trabajo, como se indica en el instructivo del proveedor (50 partes de solución A por cada parte de solución B) y se incubaron durante 30 min. Al finalizar se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica y el contenido de proteína se calculó con base a una curva estándar con albúmina sérica bovina (2 mg/mL BSA, por sus siglas en inglés; Sigma®, Merck, DE); de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

## 5.8. Ensayos de acumulación de lípidos

### 5.8.1. Análisis al microscopio

La acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma (esteatosis micro y macrovacuolar) se analizó mediante microscopía óptica. Las células HepG2 se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^4$  en placas de cultivo de 60 mm y se incubaron con sus respectivos tratamientos durante 48 h. Al finalizar, los hepatocitos se fotografiaron con un microscopio óptico (Zeiss, Oberkochen, DE) y se examinaron con un objetivo de 40X. Las características de las células se analizaron mediante el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, US) (Trepiana et al., 2020).

También se analizaron al microscopio los cambios morfológicos de las células HepG2 como la adhesión a la placa, la presencia de gránulos en el citoplasma, cambios en la forma y el tamaño del núcleo (Izdebska et al., 2018).

### 5.8.2. Ensayo de rojo oleoso

Para poder cuantificar los lípidos totales contenidos en los hepatocitos, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron empleando formalina al 10 % (10 % formaldehído, 90 % PBS) por 30 min. Se lavaron 3-4 veces con agua destilada (dH<sub>2</sub>O) y se añadió isopropanol al 60 % durante 5 min. Posteriormente, se removió el isopropanol y las células se tiñeron con la solución de trabajo del rojo oleoso (Solución stock rojo oleoso / agua destilada en una relación 3:1) y se incubaron por 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se removió el rojo oleoso y las células se lavaron 2-3 veces con dH<sub>2</sub>O para eliminar el color de fondo hasta que la solución se tornó transparente. Las células cubiertas con dH<sub>2</sub>O se visualizaron en un microscopio óptico (Zeiss, DE). Posteriormente, se añadió isopropanol (200 µL) a cada pocillo y, después de agitar e incubar a temperatura ambiente durante 15 min, el extracto se transfirió a una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia a 510 nm (Biovision, 2021).

### 5.8.3. Determinación de triglicéridos (TG)

Para la determinación del contenido de TG se empleó el kit Triglycerides GPO-POD enzymatic colorimetric kit (Spinreact, ES). A continuación, se describe el protocolo del ensayo de acuerdo al fabricante:

Se sembró un número inicial de  $1 \times 10^7$  células en placas de 60 mm con los tratamientos a determinar. Después de incubarse por 48 h, los tratamientos se retiraron y se procedió a lisar las células por choque térmico con ayuda de PBS (2 mL por placa). Una vez obtenido el lisado celular se procedió a añadir los reactivos en una placa de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 200 µL del reactivo y 10 µL de la muestra a analizar; así mismo, se utilizó un control negativo (200 µL del reactivo) y una solución patrón (200 µL del reactivo + 10 µL patrón). Una vez realizado este procedimiento, la placa se incubó por 5 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 505 nm. Por último, se aplicó la siguiente fórmula para los datos obtenidos:

$$\frac{(A)Muestra - (A)Blanco}{(A)Patrón - (A)Blanco} \times \text{concentración del patrón} = \frac{mg}{dL} \text{ de triglicéridos en la muestra}$$

Los datos se expresaron en mg/dL de triglicéridos TG.

## 5.9. Ensayos para determinar estado redox de las células HepG2

### 5.9.1. Cuantificación de la concentración de grupos tioles totales (GSH)

Se realizó la cuantificación de grupos tioles totales con el objetivo de mostrar el nivel antioxidante endógeno de las células HepG2, tanto en los experimentos suplementados con RSV y RSV – MCM2. Los hepatocitos se sembraron en placa de 60 mm a una concentración de  $4 \times 10^4$  células por placa y se incubaron por 48 h con los respectivos tratamientos. Posteriormente, se retiraron los tratamientos, se enjuagaron las placas con 500  $\mu$ L de PBS y se procedió a la lisis celular a través de choque térmico adicionando PBS (3 mL por placa) y se recolectó el lisado celular en un tubo de 15 mL. En un tubo Eppendor se colocaron 120  $\mu$ L de agua destilada, 150  $\mu$ L de lisado celular y 30  $\mu$ L de TCA 20% (por cada tratamiento); se homogenizaron las muestras en un vortex y se dejaron reposar por 30 min en hielo. Una vez terminado el tiempo, las muestras se centrifugaron a 8750 rpm por 5 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante en un tubo Eppendor. En una placa de 96 pozos, para cada tratamiento se añadió 150  $\mu$ L de solución Tris-EDTA, 50  $\mu$ L de muestra y 100  $\mu$ L de solución DTNB [ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)] con metanol; la placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 412 nm (Tietze, 1969). Los resultados se extrapolaron a una curva de calibración de GSH y se expresaron en  $\mu$ M por mg de proteína.

### 5.9.2. Actividad de enzima glutatión peroxidasa (GPx)

La medición de la actividad GPX se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Paglia y Valentine (1967), la cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPX, completando el ciclo mediante la conversión GSSG a GSH utilizando la enzima glutatión reductasa (GR) y NADPH ( $\beta$ -

nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). Aunado a lo anterior, se evaluó la disminución de la absorbancia de NADPH a 340 nm durante la oxidación de NADPH a NADP, lo cual es un indicador de la actividad GPX, por ser considerado un factor limitante de la velocidad de la reacción acoplada.

Para determinar la actividad enzimática, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: en una placa de 96 pozos se añadieron 100 µL de solución amortiguadora Tris-EDTA (50 mM/0.5 mM, pH 8), seguido de 50 µL de la mezcla de GSH/GR (42 mM/10 U/mL, Sigma®). Posteriormente se añadió el lisado celular (50 µL) y por último 50 µL de NADPH (5 mM, Sigma®). Antes de llevar a cabo la lectura, se adicionaron 50 µL de hidroperóxido de cumeno (50 mM, Sigma®). A partir de la adición del hidroperóxido de cumeno, se tomó el tiempo de 10 s y se realizaron 20 lecturas cada 6 s a una absorbancia de 340 nm. Para poder extrapolar los resultados obtenidos, la actividad de GPX se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$Actividad = \frac{\Delta A_{340} \times DF}{6.22 \times V}$$

Donde:

$\Delta A_{340}$  = |A<sub>340</sub>/min, blanco| - |A<sub>340</sub>/min, muestra|

6.22 = Coeficiente de absortividad (mM) para NADPH

DF = Factor de dilución

V = Volumen de la muestra (mL)

La actividad de GPX fue expresada en nmol/min/mL (Unidades/mL) y se normalizó con el contenido de proteína en mg/mL de cada una de las muestras (Unidades/mg de proteína).

### 5.9.3. Actividad de enzima glutatión S-transferasa (GST)

La actividad de GST se analizó de acuerdo a Habig y colaboradores (1974). La mezcla de reactivos se colocó en el siguiente orden en una placa de 96 pozos: 170 µL de solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 6.5) y 30 µL de CDNB (1-cloro-

2,4-dinitrobencono 1 mM). La placa se incubó por 10 min a 37 ° C y posteriormente se añadieron 30 µL de lisado celular y antes de realizar la lectura, se añadieron 30 µL de GSH (1 mM). Se realizaron 5 lecturas por minuto a 340 nm. Una unidad de GST representó la cantidad de enzima requerida para conjugar GSH con 1 µmol CDNB/min y la actividad de GST se expresó como unidades de GST por mg de proteína. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\Delta A_{340}) / \text{min} = A_{340} \left( \frac{\text{Lectura final} - \text{Lectura inicial}}{\text{Tiempo de reacción (30 s)}} \right)$$

#### 5.9.4 Ensayo de TBARS para determinar peroxidación de lípidos

Los productos de peroxidación lipídica, hidroperóxidos lipídicos y aldehídos, como el malondialdehído (MDA), se midieron utilizando el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Una vez removido el medio de cultivo, se llevó a cabo una lisis celular. En la reacción, el MDA se combinó con ácido tiobarbitúrico (TBA) en una estequiometría de 1:2 para formar un aducto fluorescente que se midió a una longitud de onda de excitación de 521 nm y una longitud de onda de emisión de 552 nm. Las TBARS se expresan como equivalentes de MDA, normalizados a proteína celular total (Dubuisson et al., 2000).

#### 5.10. Ensayos para determinar inflamación en células HepG2 y macrófagos

##### 5.10.1. Cuantificación de nitritos por el reactivo de Griess

Los niveles de nitritos/nitratos se cuantificaron en el medio y sobrenadantes de los cultivos de macrófagos RAW 264.7 y en las células HepG2 usando la reacción de Griess. Brevemente, se colocaron 50 µL de cada tratamiento en una placa de 96 pozos y se añadieron 50 µL de sulfanilamida, dejando incubar por 5 min a 37 °C; posteriormente, se adicionaron 50 µL de N-1-(naftil)-etilendiamina y se incubó por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la lectura de las muestras a 546 nm. Los resultados obtenidos fueron referidos a un patrón de nitrito de sodio y expresados en µM (Rada et al., 2003).

### 5.10.2. Determinación de expresión relativa de marcadores relacionados al proceso de polarización de macrófagos M2 por qPCR (Arg1, IL-1, IL-6 e IL-10).

La técnica qPCR se llevó a cabo para poder determinar el efecto del RSV en la polarización de macrófagos cultivados con alta glucosa, estimulados con 60 ng/mL de LPS y suplementados con 10  $\mu$ M de RSV y su impacto en la acumulación de lípidos, así como el estado redox de hepatocitos suplementados con alta glucosa e insulina. A continuación, se describen las metodologías empleadas:

#### 1.- Extracción de RNA total

##### a) Homogenización:

- El medio de cultivo fue descartado al centrifugar las células a 5,000 rpm durante 5 min; una vez retirado el medio, se procedió a lavar la pastilla con 1 mL de agua DEPC.

- Se adicionó 1 mL de TRIzol frío para re suspender las células, después la pastilla se homogenizó con ayuda de perlas de vidrio a 3,500 rpm durante 7 s; al terminar se colocó en congelación a una temperatura de -20 °C.

- Una vez realizada la homogenización, la muestra fue centrifugada a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo estéril.

##### b) Separación:

- La muestra homogenizada se incubó por 5 min a temperatura ambiente; esto con el objetivo de disociar los complejos de proteínas nucleares.

- Se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo y durante 15 se agitó vigorosamente por 15 s; posteriormente, la muestra en posición vertical se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente.

- Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C.

- Al terminar, a través de una fase inferior roja (fase fenol-cloroformo) la muestra se separó en una interfase y en una fase incolora superior, donde estaba contenido el ARN, esta última fue recolectada en un tubo nuevo y estéril.

c) Precipitación:

- Por cada 1 mL de TRIzol empleado en la homogenización, se adicionaron 500 µL de isopropanol a la fase acuosa

- Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y en posición vertical.

- Se centrifugó a 10,000 rpm por un tiempo de 10 min a 4 °C.

d) Lavado:

- El sobrenadante fue removido y descartado

- Al pellet se le adicionó 1 mL de etanol frío al 75 % para efectuar el lavado.

- Se centrifugó a 6,000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C.

- Al término de la centrifugación, el sobrenadante fue removido cuidadosamente.

e) Disolución:

- Se secó a temperatura ambiente, colocando en una toalla de papel estéril el tubo con el ARN.

- Se adicionaron 50 µL de agua DEPC.

- Mediante pipeteo el RNA fue disuelto suavemente.

f) Almacenamiento:

- Al finalizar el tratamiento, el ARN aislado fue almacenado a -70 °C hasta llevar a cabo la evaluación por qPCR.

## 2.- Obtención del cDNA

La obtención del cDNA se llevó a cabo de acuerdo al protocolo M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen (Madrid, ES).

En un tubo nuevo estéril se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de la extracción de RNA total y se añadió 1  $\mu\text{L}$  de random primers (200 ng), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix 10 mM y 12  $\mu\text{L}$  de agua DEPC. Durante 5 min la reacción se incubó a 65 °C y fue colocada en hielo durante 1 min.

Posteriormente, en el tubo de reacción se añadieron 4  $\mu\text{L}$  de 5X First-strand buffer y 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1 M, cuidadosamente se mezcló por pipeteo y fue incubada a 37 °C durante 2 min.

Una vez finalizada la incubación, en el tubo de reacción se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV RT, se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente a 37 °C por 50 min y finalmente a 70 °C por 15 min para concluir la reacción.

El cDNA obtenido se almacenó a una temperatura de -20 °C hasta su evaluación por qPCR (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.- Reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific.

Las soluciones contenidas en el kit fueron agitadas suavemente con vortex antes de dar inicio al protocolo.

En un tubo eppendorf estéril de 0.5 mL a temperatura ambiente se colocaron los siguientes reactivos: 12.5  $\mu\text{L}$  de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 0.8  $\mu\text{L}$  de cada par de primers, 1  $\mu\text{L}$  de DNAC y finalmente se completó la reacción con agua DEPC hasta un volumen de 25  $\mu\text{L}$ ; los componentes fueron mezclados cuidadosamente a través de pipeteo.

Las reacciones se colocaron en el equipo y se programaron las siguientes condiciones:

- 10 min a 95 °C para abrir las cadenas de cDNA

- 30 ciclos: 15 s a 95 °C (desnaturalización), 30 s a 60 °C (alineamiento), 1 min a 72 °C (extensión).
- 10 min a 72 °C y se redujo la temperatura a 4 °C por tiempo indefinido.
- La reacción fue almacenada a -20 °C hasta el inicio del análisis.

Las secuencias de primers fueron fabricados por la empresa Integrated DNA Technologies (Iowa, US) e incluyeron los siguientes genes: IL-1 (F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG; R: AAGGTCCACGGGAAAGACAC); IL-6 (F: CCACTTCACAAGTCGGAGGCTT; R: GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC); Arg1 (F: AAGACAGCAGAGGAGGTG; R: AGTCAGTCCCTGGCTTAT); IL-10 (F: GCCTTGCAGAAAAGAGAGCT ; R: AAAGAAAGTCTTTCACCTGGC).

El análisis de resultados se realizó empleando el software StepOne™, el cual utiliza el método comparativo  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) para cuantificar la expresión genética relativa.

Esto es relevante para poder determinar el efecto del RSV en la polarización de macrófagos M2 y el posterior impacto del medio MCM2 en la acumulación de lípidos y estado redox de hepatocitos suplementados con alta concentración de glucosa e insulina.

#### 5.11. Diseño y análisis estadístico

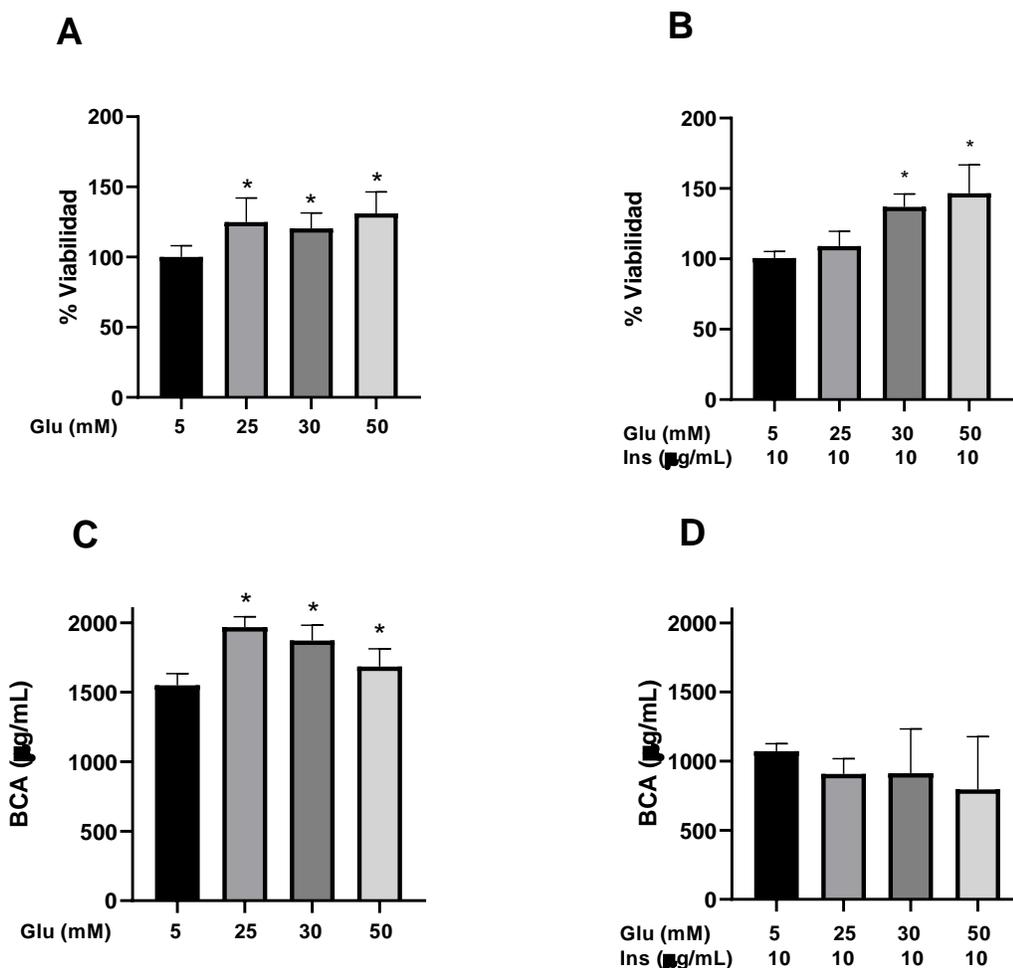
Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. Para el análisis de datos se aplicó una ANOVA, seguida de una comparación de medias (bajo el mismo estímulo), mediante la prueba de Dunnett, donde los controles representaron las condiciones fisiológicas (glucosa 5 mM), el modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa + 10  $\mu$ g/mL insulina) y el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con RSV 10  $\mu$ M. Los resultados se consideraron como estadísticamente significativos con una  $\alpha = 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete GraphPad Software versión 8.0.1 (GraphPad Software, US).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Determinación de la concentración de glucosa e insulina para el modelo *in vitro* de EHGNA.

Para determinar la viabilidad de los hepatocitos en concentraciones altas de glucosa (con y sin insulina) en el cultivo y descartar la presencia de toxicidad en el mismo, se llevaron a cabo los ensayos de MTT y BCA, observando que en los tratamientos sin insulina (Figura 6A), la viabilidad de los hepatocitos en concentraciones de 25, 30 y 50 mM de glucosa aumenta en un rango de 20-30 % con respecto a la de los hepatocitos control en 5 mM de glucosa. De manera similar, se observa un aumento en la concentración de proteína (Figura 6C) donde se muestra una tendencia a normalizarse con el control (5 mM) conforme aumenta la concentración de glucosa. Al mismo tiempo se realizó el ensayo de rojo oleoso y los resultados se muestran en la sección 6.2., donde no se observó acumulación de lípidos para establecer el modelo *in vitro* de EHGNA. Por lo anterior, se procedió a añadir 10 µg/mL de insulina para facilitar la entrada de glucosa a los hepatocitos y obtener la acumulación lipídica evidenciada por la aparición de gotas lipídicas (Figura 6B) (Wang et al., 2019).

En los cultivos con insulina añadida se puede observar un aumento de viabilidad de los hepatocitos a las concentraciones de 30 y 50 mM (36.2 y 43.0 %, respectivamente), siendo estadísticamente mayor en los cultivos con respecto al control (glucosa 5 mM) y 13.3 y 13.2 % más respecto a los cultivos de los hepatocitos a las concentraciones de 30 y 50 mM sin insulina, respectivamente. Mientras que, la cantidad de proteína intracelular de los hepatocitos no presentó cambios representativos en los cultivos de 25, 30 y 50 mM con insulina, mostrando concentraciones de proteína similares a la del control (glucosa 5 mM) (Figura 6D).



**Figura 6.** Efecto de la concentración de glucosa e insulina en la viabilidad (MTT) y la concentración de proteína (BCA) intracelular en las células HepG2. A y C) ausencia de insulina, B y D) presencia de insulina. Insulina (Ins, 10 µg/mL). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM.

Los resultados aparentemente muestran que los hepatocitos no presentan toxicidad en las tres concentraciones de glucosa. Por lo anterior, se procedió a un análisis al microscopio para poder establecer el modelo de EHGNA. Las células HepG2 tratadas con glucosa 50 mM e insulina mostraron una morfología alterada

evidenciada por el desprendimiento, la flotación de células y la ausencia de formación de conglomerados en el cultivo (Imágenes no mostradas). Chandrasekaran y colaboradores (2010) reportan que la concentración de 50 mM de glucosa aumenta la viabilidad celular; sin embargo, después de las 48 h (72 - 96 h) se produce malformación en las células HepG2, así como una disminución significativa de la viabilidad (65 – 70%, respectivamente). Por otro lado, se ha demostrado que la suplementación de 30 mM de glucosa no genera citotoxicidad en la línea celular HepG2, incluso añadiendo 100 nM (3.625 µg/mL) de insulina; sin embargo, esta concentración induce esteatosis microvascular en la mayoría de las células (Izdebska et al., 2018; Ding et al., 2019). Resultados similares a estos estudios fueron obtenidos en nuestro estudio bajo condiciones similares. Por lo anterior, se procedió a la determinación de la acumulación de lípidos en los hepatocitos para confirmar la inducción de EHGNA *in vitro*.

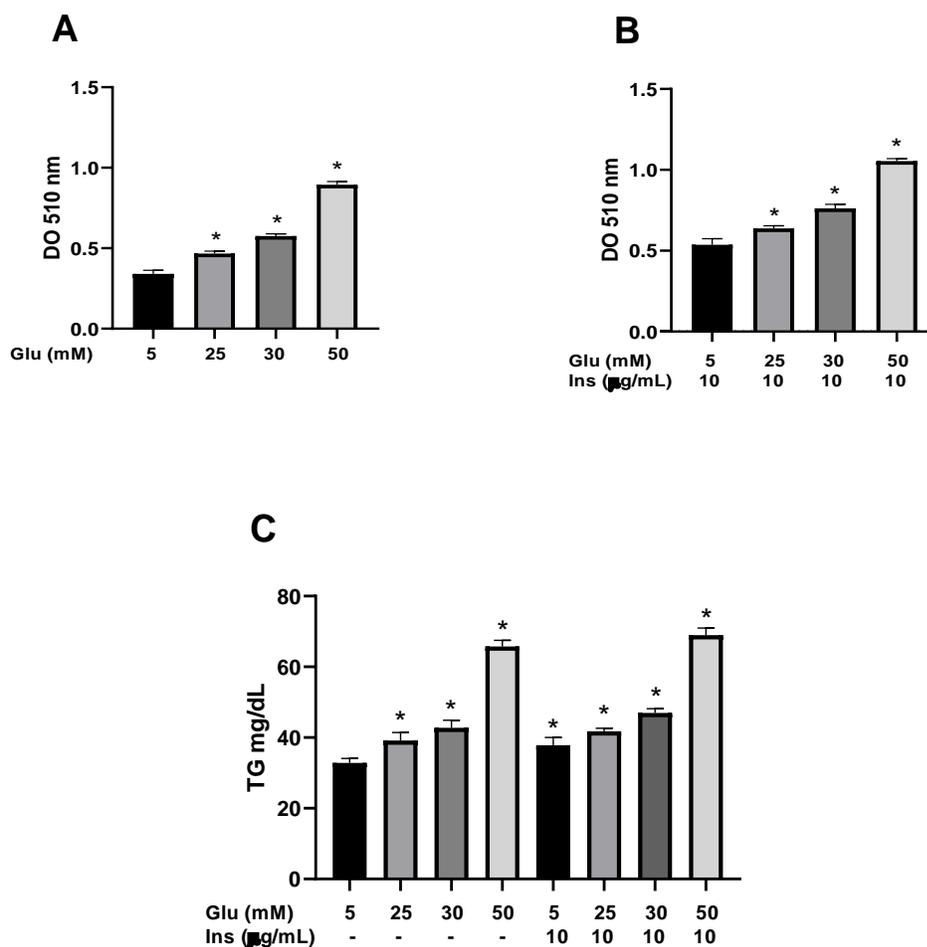
## 6.2. Efecto de la concentración de glucosa e insulina en la acumulación de gotas lipídicas en las células HepG2

La acumulación de lípidos en las células es esencial para la determinación del modelo *in vitro* de EHGNA, por lo que se llevó a cabo el ensayo de rojo oleoso para identificar y cuantificar las gotas lipídicas dentro de éstas. En la Figura 7A se puede observar que los hepatocitos con concentraciones de 25, 30 y 50 mM de glucosa sin insulina muestran un aumento en la acumulación de lípidos (37.0, 68.9 y 162.4 %, respectivamente), comparado con los hepatocitos control (5 mM). Sin embargo, a través del ensayo de rojo oleoso al microscopio no se observa claramente la presencia de gotas lipídicas dentro de los hepatocitos (Figura 8). Por el contrario, al observar y analizar las células HepG2 suplementadas con glucosa e insulina (10 µg/mL), los hepatocitos muestran un aumento significativo en la densidad óptica a 25, 30 y 50 mM (18.91, 41.94 y 96.6 %, respectivamente), así como la presencia de

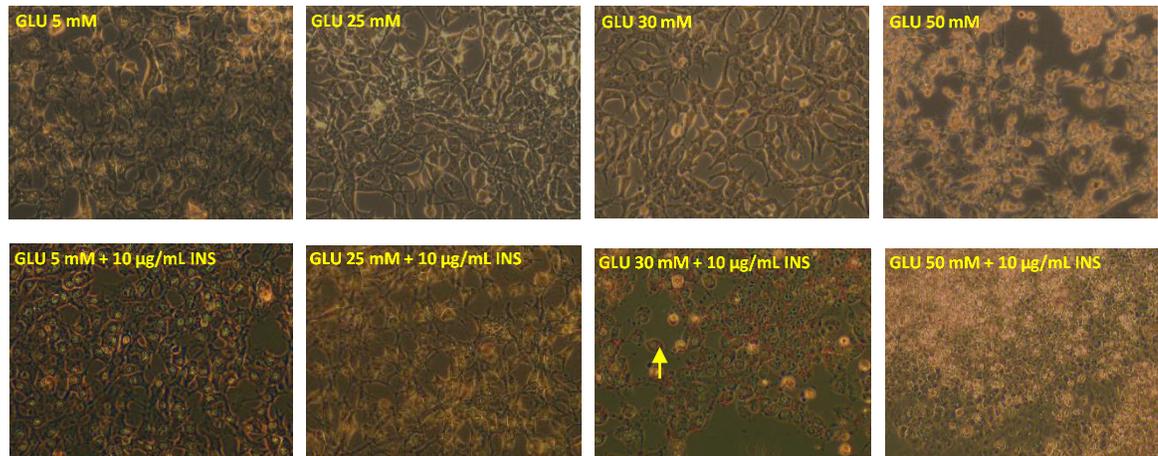
gotas lipídicas en el cultivo de 30 mM de glucosa + 10 µg/mL de insulina (Figuras 7B y 8).

Zang y colaboradores (2004) reportan que las células HepG2 expuestas a niveles altos de glucosa (30 mM), sin insulina, por 24 h presentan acumulación lipídica hepatocelular; sin embargo, el análisis al microscopio no muestra la aparición de gotas lipídicas en las células. Por el contrario, Yue y colaboradores (2019) coinciden que las células HepG2 expuestas a una concentración alta de glucosa (30 mM) y con 100 nmol/L (3.625 µg/mL) de insulina presentan acumulación de lípidos evidenciada por la aparición de gotas lipídicas por el ensayo de rojo oleoso. Los resultados fueron consistentes al cuantificar los TG totales en las muestras (Figura 7C). Si bien los hepatocitos con 50 mM de glucosa con y sin insulina presentan una mayor acumulación de lípidos y TG, las células presentan condiciones de citotoxicidad descritas previamente; por lo cual, esta concentración se descartó a partir de este bloque experimental.

Por otro lado, los cultivos con concentraciones de 25 y 30 mM de glucosa sin insulina presentan un aumento en la concentración intracelular de TG con respecto al control de 5 mM (119.2 y 130.2 %, respectivamente). De igual manera, los cultivos con insulina presentaron una tendencia similar, mostrando un incremento de 127.1 y 142.9 % (25 y 30 mM, respectivamente), siendo esta última la concentración seleccionada para el modelo *in vitro* de EHGNA, al presentar mayor concentración de lípidos y gotas lipídicas dentro de las células sin presencia de toxicidad (Figura 8).



**Figura 7.** Efecto de la concentración de glucosa en la acumulación de lípidos determinados mediante la densidad óptica de ensayos de rojo oleoso en células HepG2 sin (A) y con (B) 10 µg/mL de insulina. C) Cuantificación de TG totales en lisis de células HepG2 sin y con 10 µg/mL de insulina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM.



**Figura 8.** Imágenes de células HepG2 de ensayo de rojo oleoso con diferentes concentraciones de glucosa sin y con insulina 10 µg/mL obtenidas en un microscopio de fases (20 X). Las flechas indican las gotas lipídicas en las células.

Una vez establecido el modelo (30 mM de glucosa + 10 µg/mL de insulina) se procedió a evaluar primeramente el efecto del RSV en la viabilidad; posteriormente, la acumulación de lípidos y el estado redox en el modelo *in vitro* de EHGNA.

### 6.3. Efecto de la concentración de resveratrol (RSV) en la viabilidad del modelo *in vitro* de EHGNA

Para determinar los efectos tóxicos del RSV se evaluó la viabilidad de los hepatocitos (MTT) y la concentración de proteína (BCA) en condiciones de alta glucosa (30 mM), sin y con insulina, adicionando diferentes concentraciones de RSV (1, 10, 25, 50 y 100 µM).

Con respecto a los tratamientos sin insulina, podemos observar un aumento significativo de la viabilidad del 20.4 % en los hepatocitos suplementados con glucosa alta (30 mM) con respecto al control basal de 5 mM de glucosa, y la cual disminuyó estadísticamente (27.8, 20.3, 25.3 y 37.2 %) con las diferentes concentraciones de RSV (1, 25, 50 y 100 µM, respectivamente). Es importante

resaltar que la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de RSV no afectó significativamente, ya que la viabilidad celular disminuyó solamente en un 2.21 % con respecto a la viabilidad de los hepatocitos con glucosa 30 mM. Cuando se compararon los tratamientos de RSV con el cultivo control (glucosa 5 mM) se puede observar la disminución del 24.4% en la viabilidad de los hepatocitos al suplementar con la concentración de 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), provocando un posible efecto tóxico para el cultivo. En general, la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de RSV fue la única concentración en la que la viabilidad de las células fue similar al control de EHGNA (Figura 9A). De manera similar, Nawaz y colaboradores (2007) observaron que la concentración de RSV 100  $\mu\text{M}$  produce muerte celular en la línea HepG2 a partir de las 24 h de incubación.

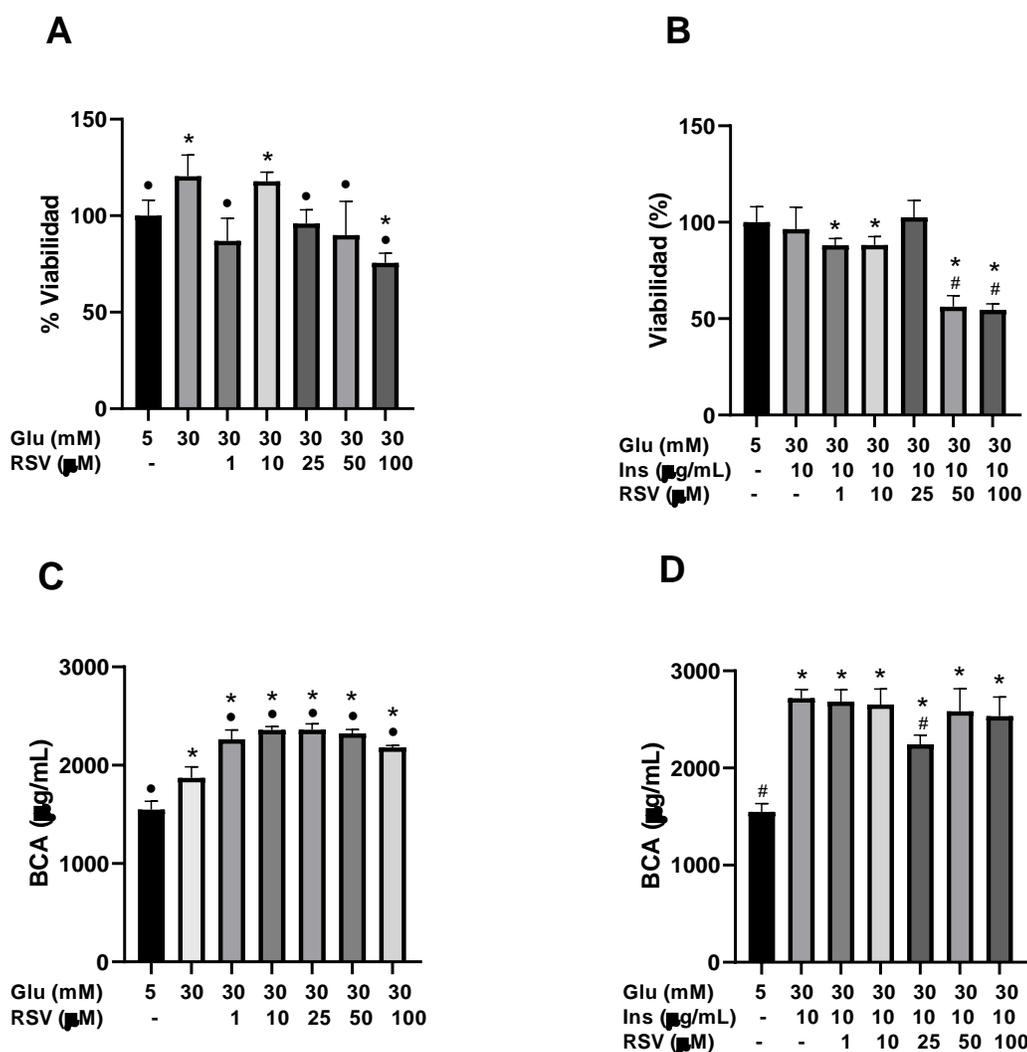
Al realizar el ensayo de BCA en los mismos tratamientos, se observó un aumento del 20.7 % en la cantidad de proteína en el cultivo de hepatocitos suplementados con 30 mM de glucosa con respecto a la proteína contenida en los hepatocitos con glucosa 5 mM. De manera similar, se observaron aumentos significativos en la cantidad de proteína intracelular con la suplementación de RSV (1  $\mu\text{M}$  - 46.1 %, 10  $\mu\text{M}$  - 52.2 %, 25  $\mu\text{M}$  - 52.3 %, 50  $\mu\text{M}$  - 49.9 %, 100  $\mu\text{M}$  - 40.7 %), en comparación con la del cultivo control (glucosa 5 mM) (Figura 9C). Se mostró una tendencia similar al observar un aumento significativo en los cultivos con las 5 diferentes concentraciones (1  $\mu\text{M}$  - 20.9 %, 10  $\mu\text{M}$  - 25.9 %, 25  $\mu\text{M}$  - 26.1 %, 50  $\mu\text{M}$  - 24.1 %, 100  $\mu\text{M}$  - 16.5 %) (Figura 9C), en comparación con la cantidad de proteína del cultivo con glucosa 30 mM, lo que sugiere que la menor viabilidad de las células HepG2 en glucosa alta y suplementadas con RSV no se debe a un menor número de células, sino probablemente a una menor funcionalidad celular.

De igual manera, se llevaron a cabo los ensayos de MTT y BCA para el modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM de glucosa y 10  $\mu\text{g/mL}$  de insulina) adicionando las concentraciones de RSV anteriormente mencionadas. No se encontraron cambios estadísticamente significativos en cuando a la viabilidad entre los hepatocitos con glucosa basal (5 mM) y los hepatocitos con glucosa alta (30 mM). Sin embargo, al comparar el modelo de EHGNA, la viabilidad de las células HepG2 suplementados

con RSV a las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyó de manera significativa en un 40.3 y 41.9 %, respectivamente (Figura 9B). Por el contrario, no se observaron cambios en la viabilidad de los hepatocitos del modelo *in vitro* suplementados con RSV 1, 10 y 25  $\mu\text{M}$ . Al comparar con los hepatocitos control (glucosa 5 mM), la viabilidad de los hepatocitos del modelo de EHGNA suplementados con las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$  de RSV disminuyó un 11.8 y 14.8 %, respectivamente; sin embargo, este efecto fue más significativo para 50 y 100  $\mu\text{M}$  de RSV (43.8 y 45.4 %, respectivamente), observándose un efecto tóxico para las células.

La cantidad de proteína en el cultivo de hepatocitos con 30 mM de glucosa aumentó significativamente un 75.4 % con respecto al cultivo de hepatocitos control (glucosa 5 mM). En el modelo *in vitro* de EHGNA, no se observaron cambios significativos en el contenido de proteína celular de los cultivos con las diferentes concentraciones de RSV. Sin embargo, la concentración de 25  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente el contenido de proteína en las células HepG2 en un 30.6 %. Por el contrario, al realizar la comparación con el cultivo control (glucosa 5 mM), la cantidad de proteína intracelular aumentó significativamente con las 5 concentraciones de RSV (1  $\mu\text{M}$  - 73.1 %, 10  $\mu\text{M}$  - 71.2 %, 25  $\mu\text{M}$  - 44.7 %, 50  $\mu\text{M}$  - 66.6 % y 100  $\mu\text{M}$  - 63.5 %) (Figura 9D).

Varios estudios *in vitro* han utilizado concentraciones elevadas de RSV, sin observar efectos adversos (Stervbo et al., 2006; Shang et al., 2008; Calabrese et al., 2010). Sin embargo, nuestros hallazgos observados en bajas concentraciones de RSV son fisiológicamente relevantes, ya que son las concentraciones encontradas en plasma ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ), por lo que se ha recomendado la evaluación de bajas concentraciones (10  $\mu\text{M}$ ) (Hosseini et al., 2019). Aunado a esto, en el presente proyecto también se comprobó este efecto tóxico en las concentraciones altas de RSV (50 y 100  $\mu\text{M}$ ), particularmente con RSV 100  $\mu\text{M}$  con y sin insulina (Figuras 9A y 9B).



**Figura 9.** Efecto de la concentración de RSV en un modelo *in vitro* de EHGNA en cultivos de células HepG2 sobre la viabilidad celular (MTT) (A y B) y la cantidad de proteína intracelular (BCA) (C y D). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \*Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. •Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos tratados solamente con alta glucosa (30 mM). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa + 10  $\mu$ g/mL insulina).

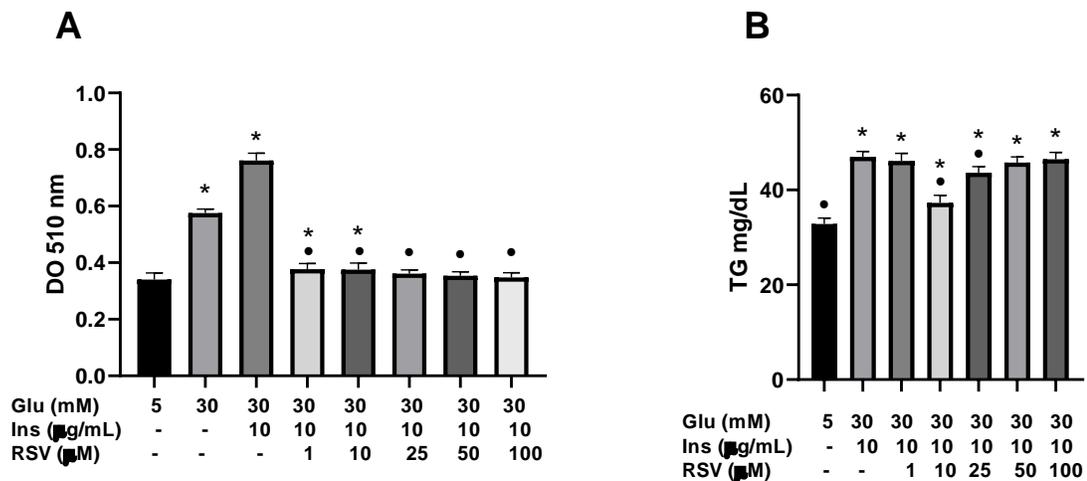
#### 6.4. Efecto de la concentración de resveratrol (RSV) en la acumulación de lípidos del modelo *in vitro* de EHGNA.

Como se estableció previamente, la concentración de lípidos de las células HepG2 en condiciones de glucosa alta (30 mM) e insulina (10 µg/mL) aumentó significativamente (123.5 %) con respecto a la del cultivo control (glucosa 5 mM). Posteriormente, y con el objetivo de observar un posible efecto supresor de esta concentración de lípidos, los hepatocitos se suplementaron con las diferentes concentraciones de RSV (1, 10, 25, 50 y 100 µM) y se llevó a cabo el ensayo de rojo oleoso. Los resultados muestran una disminución significativa dosis dependiente de la acumulación lipídica en los hepatocitos suplementados con las 5 diferentes concentraciones de RSV (1 µM - 112.7 %, 10 µM - 113.3 %, 25 µM - 117.5 %, 50 µM - 119.7 % y 100 µM - 121.3 %), con respecto al control del modelo *in vitro* de EHGNA (Figura 10A).

Como prueba complementaria se realizó la determinación de TG totales en lisis de células HepG2 suplementadas con las mismas concentraciones de RSV anteriormente mencionadas (Figura 10B). Al comparar los datos obtenidos con el cultivo del modelo *in vitro* de EHGNA se puede observar una disminución estadísticamente significativa en el contenido de TG en las concentraciones de 10 y 25 µM de RSV (20.5 y 7.0 %, respectivamente). Por el contrario, al comparar con el cultivo control (glucosa 5 mM) se observa que los niveles de TG totales aún permanecen significativamente mayores en los cultivos del modelo *in vitro* después de la suplementación con RSV (1 µM - 40.4 %, 10 µM - 13.5 %, 25 µM - 32.8 %, 50 µM - 39.4 % y 100 µM - 41.4%), siendo los cultivos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con la concentración de RSV 10 µM con valores similares al cultivo control (glucosa 5 mM).

Con base a los resultados anteriores se sugiere que la suplementación de 10 µM de RSV muestra el mejor efecto protector en las células HepG2 con alta glucosa e insulina (modelo *in vitro* de EHGNA), incluso tiene una tendencia a presentar

concentración de TG similar al cultivo control (glucosa 5 mM) (Figura 10B). Estos resultados son similares a los reportados por otros autores, los cuales indican que la suplementación con 10  $\mu$ M de RSV a las células HepG2 expuestas a altas concentraciones de glucosa es capaz de reducir la lipogénesis *de novo*, disminuyendo la disponibilidad de los ácidos grasos y, consecuentemente, la síntesis de TG (Hou et al., 2008; Gnoni et al., 2009).



**Figura 10.** Efecto de la concentración de RSV en la acumulación de lípidos evaluados mediante la densidad óptica de ensayos de rojo oleoso en el modelo *in vitro* de EHGNA (A) y con el contenido de TG totales en lisis de células HepG2 en el modelo *in vitro* de EHGNA (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10  $\mu$ g/mL insulina).

#### 6.5. Polarización de macrófagos y obtención de MCM2.

La polarización de los macrófagos M1/M2 juega un papel crucial en diversos procesos fisiopatológicos, como la inflamación, la cual está presente en la EHGNA, la hepatitis, la fibrosis y el carcinoma hepatocelular, lo que sugiere que la

polarización de los macrófagos puede estar involucrada en el desarrollo y la reversión de estas enfermedades hepáticas. En este sentido, el propósito de la siguiente etapa del estudio fue evaluar la contribución adicional de MCM2 en la viabilidad, la acumulación de lípidos y el estado redox de las células HepG2 suplementadas con RSV. Para ello, los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron en condiciones similares de glucosa que el modelo in vitro de EHGNA (30 mM), estimuladas con 60 ng/mL de LPS y suplementados con RSV (10  $\mu$ M) y se procedió a realizar ensayos de viabilidad (MTT y BCA) e inflamación (ILs y ON).

Como se observa en la Figura 11A, el incremento en la concentración de glucosa (30 mM) y la estimulación con 60 ng/mL de LPS disminuyó estadísticamente la viabilidad de los macrófagos en un 17.4 %, en comparación con los macrófagos control (glucosa 5 mM). También se observó que la suplementación de RSV 10  $\mu$ M aumentó de la viabilidad en un 11.40 %, en comparación con la del cultivo con alta glucosa (30 mM y 60 ng/mL de LPS). Resultados similares se obtuvieron para la determinación de proteína total (Figura 11B).

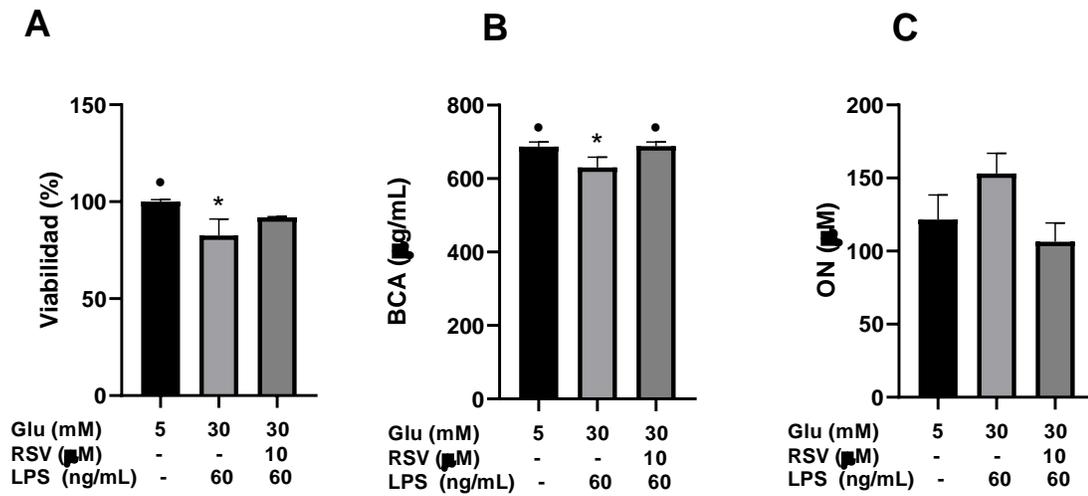
Con respecto al marcador pro-inflamatorio, se llevó a cabo el ensayo de Griess para la cuantificación de nitritos/nitratos en el medio y sobrenadante del cultivo de macrófagos RAW 264.7. De acuerdo a lo esperado, en la Figura 11C se puede observar un aumento en el contenido de nitritos (31.4 %) en los macrófagos cultivados con 30 mM de glucosa y estimulados con 60 ng/mL de LPS, en comparación con los niveles de NO en los macrófagos control (glucosa 5 mM). Por el contrario, se observa una disminución del 30.4 % en el nivel de NO en los macrófagos cultivados con 30 mM de glucosa – 60 ng/mL de LPS y suplementados con RSV 10  $\mu$ M, en comparación con el contenido de nitritos totales en los macrófagos con 30 mM glucosa y estimulados con 60 ng/mL de LPS.

De manera complementaria a la cuantificación de nitritos/nitratos, para la evaluación del proceso inflamatorio se llevó a cabo la determinación de la expresión relativa de genes relacionados al proceso de polarización de macrófagos pro-inflamatorios o M1 (IL-1 e IL-6) y anti-inflamatorios o M2 (Arg1 e IL-10) por qPCR. En la Figura 12A

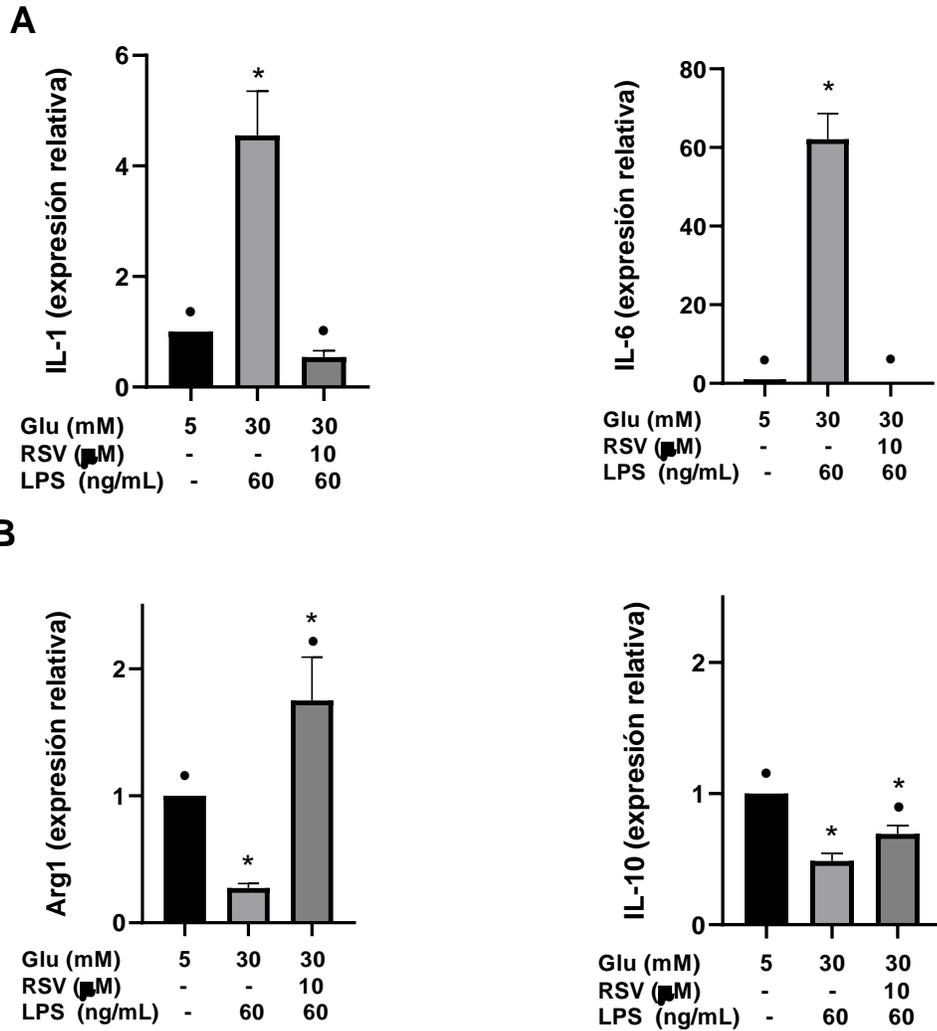
se puede observar los resultados de los genes pro-inflamatorios, donde la expresión del mRNA de IL-1 en los macrófagos con glucosa alta y LPS aumentó 3.5 veces más en comparación con la del control de los macrófagos con glucosa 5 mM. De acuerdo a lo esperado, la suplementación con 10  $\mu$ M de RSV disminuyó en un 88.1 % la expresión de IL-1 en comparación con la expresión de los macrófagos con tratamiento de alta glucosa y LPS, incluso siendo éste último menor (45.9 %) al valor de los macrófagos del control basal (glucosa 5 mM). Se puede observar un comportamiento similar en la expresión de la IL-6, donde al agregar glucosa alta y 60 ng/mL de LPS en los macrófagos se observa un aumento estadísticamente significativo de 61 veces más en comparación con la expresión del control basal (glucosa 5 mM). Una vez más, la expresión de IL-6 disminuyó en un 99.8 % al adicionar 10  $\mu$ M de RSV, en comparación con la expresión de los macrófagos con tratamiento de alta glucosa y LPS, teniendo valores similares al nivel de expresión en los macrófagos del control basal de 5 mM de glucosa (1.4 %).

Al realizar la determinación de la expresión relativa de Arg1 e IL-10 (marcadores anti-inflamatorios M2), se puede observar que la expresión del gen Arg1 disminuyó significativamente en un 72.6 % al agregar glucosa alta y LPS a los macrófagos, en comparación con los macrófagos con glucosa 5 mM. De acuerdo a lo esperado, la suplementación con 10  $\mu$ M de RSV aumentó 5.4 veces más la expresión del mRNA de Arg1, en comparación con la expresión de Arg1 de los macrófagos con glucosa alta y LPS, incluso superando por 2.7 veces más los niveles de expresión en los macrófagos control con glucosa basal (5 mM). Al determinar la expresión de la IL-10 en los mismos tratamientos, se observó una disminución del 51.2 % de la expresión en los macrófagos con glucosa alta y LPS, en comparación con los macrófagos con glucosa 5 mM. Por el contrario, la adición de 10  $\mu$ M de RSV aumentó la expresión de IL-10 en un 42.2 %, en comparación con la expresión de los macrófagos con glucosa alta y LPS. sin embargo, se observa un 30.7 % por debajo de los valores presentados en los macrófagos control (glucosa 5 mM).

Estos resultados demuestran el efecto pro-inflamatorio de la glucosa alta – 60 ng/mL de LPS en macrófagos, lo que sugiere la polarización de los macrófagos M1. Así mismo, los resultados confirman el efecto anti-inflamatorio del RSV en los macrófagos cultivados en alta glucosa (30 mM y LPS), lo que indica la polarización de los macrófagos M2. A partir de estos resultados se procedió a la obtención del MCM2. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Oh y colaboradores (2019) en macrófagos J774A.1 suplementados con alta glucosa (33 mM) y LPS (2 µg/mL), observándose un incremento en los marcadores pro-inflamatorios (TLR4, iNOS e IL-6); mientras que, la adición del ácido asarónico (ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico), aislado a partir de extractos de perilla morada (*Perilla frutescens* L.) disminuyó la expresión relativa de estos marcadores, incrementando la expresión de la IL-10. Los autores concluyen que la adición del ácido asarónico atenuó la polarización de los macrófagos M1 inducida por la condición de glucosa alta y LPS, promoviendo la polarización M2. De manera similar, la suplementación de RSV 10 µM promovió la polarización de macrófagos M2 aún bajo condiciones de glucosa alta y LPS.



**Figura 11.** Polarización de macrófagos M2. Efecto de la glucosa alta (30 mM), estimulación con LPS (60 ng/mL) y RSV (10 μM) en la viabilidad (A), la cantidad de proteína total (B) y el grado de inflamación en macrófagos RAW 264 (C). Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los macrófagos control (glucosa 5 mM). • Indica diferencia estadística con respecto a los macrófagos control suplementados con 30 mM de glucosa.



**Figura 12.** Efecto del RSV sobre la polarización de macrófagos en condiciones de alta glucosa suplementados con LPS. Expresión relativa de mRNA para genes anti-inflamatorios (A), expresión relativa de mRNA para genes pro-inflamatorios (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes ( $n = 3$ ). \* Indica diferencia estadística con respecto a los macrófagos control (glucosa 5 mM). • Indica diferencia estadística con respecto a los macrófagos suplementados con 30 mM de glucosa con 60 ng/mL de LPS.

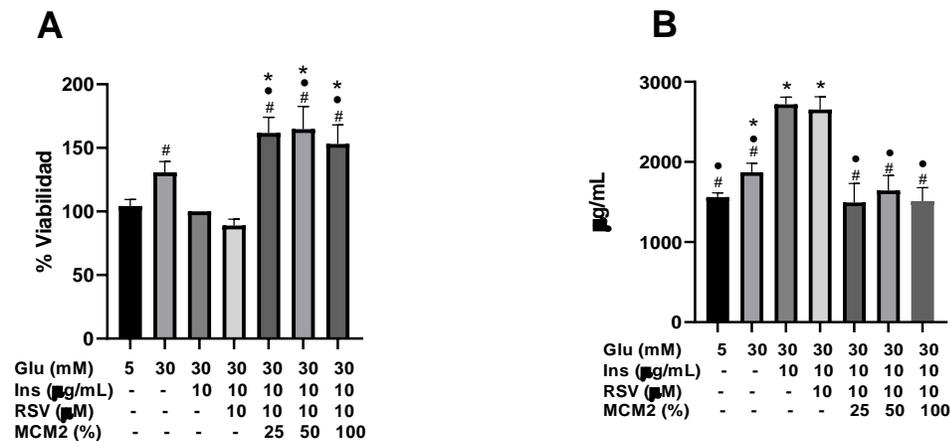
Una vez establecida la polarización de macrófagos M2 por efecto de la suplementación de RSV 10  $\mu\text{M}$  se procedió a evaluar la contribución del medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2) en la viabilidad, la acumulación de lípidos y el estado redox en el modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM de glucosa + 10  $\mu\text{g/mL}$  de insulina).

#### 6.6. Efecto de la suplementación del MCM2 sobre el RSV en la viabilidad del modelo *in vitro* de EHGNA

Las células del modelo *in vitro* de EHGNA previamente suplementadas con RSV se trataron con diferentes proporciones de MCM2 (25, 50 y 100 %) para definir la concentración que hace posible la contribución de los elementos secretados por los macrófagos M2 en el efecto protector del RSV. En este sentido, las células hepáticas se suplementaron con 25, 50 y 100 % de MCM2, porcentajes empleados en estudios con objetivos similares evaluando el medio condicionado o co-cultivos indirectos reflejando la proporción de hepatocitos:macrófagos (Melino et al., 2012; Bai et al., 2018; Padberg et al., 2021; Kawase et al., 2022).

En la Figura 13A se muestra el efecto del MCM2 sobre la viabilidad de las células HepG2 suplementadas con 10  $\mu\text{M}$  RSV. Al hacer la comparación con el cultivo de los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10  $\mu\text{g/mL}$  insulina) se puede apreciar una ligera disminución de la viabilidad en las células suplementadas con 10  $\mu\text{M}$  de RSV (11.0 %). Sin embargo, la viabilidad de los hepatocitos suplementados con 10  $\mu\text{M}$  de RSV aumentó estadísticamente al añadir las concentraciones de MCM2 (25 % MCM2 – 81.8 %, 50 % MCM2 – 85.1 % y 100 % MCM2 – 72.1%), incluso mayor al porcentaje de viabilidad de los hepatocitos control (glucosa 5 mM). Por otro lado, el contenido de proteína de los hepatocitos adicionados con MCM2 se normalizó respecto a los valores de proteína total en hepatocitos con glucosa estándar (5 mM) (Figura 13B). Estos resultados sugieren que la mayor viabilidad de las células HepG2 del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM

glucosa – 10 µg/mL insulina) y suplementadas con RSV – MCM2 no se debe a un mayor número de células, sino probablemente a una mejor funcionalidad celular inducida por los componentes secretados en el MCM2.



**Figura 13.** Efecto de la adición de MCM2 en la viabilidad de células HepG2 con alta glucosa (30 mM) e insulina (10 µg/mL) y suplementadas con RSV (10 µM). A) MTT y B) Contenido de proteína total por el método de BCA. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM.

En general, estos datos nos demuestran que la adición del MCM2 no afecta la sobrevivencia de hepatocitos suplementados con RSV. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura en condiciones de glucosa estándar adicionando 100 % de MCM2 a las células HepG2 (Bai et al., 2018) o co-cultivos indirectos en relación 1:0.4 HepG2:macrófagos M2 (Kawase et al., 2022). Sin embargo, no se tienen reportes del efecto del RSV (o algún otro fitoquímico) en un

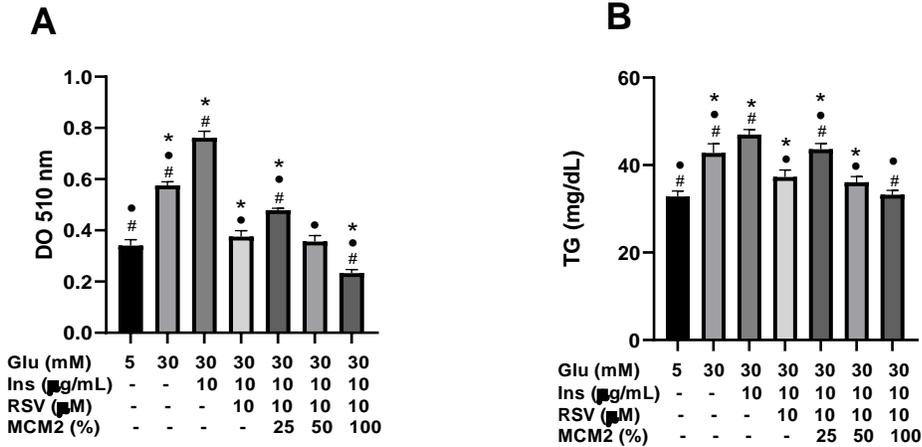
modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con MCM2 a partir de macrófagos cultivados bajo estas condiciones.

#### 6.7. Efecto de la concentración del MCM2 en la acumulación de lípidos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con RSV

Una vez evaluada la viabilidad del modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con RSV y MCM2, se procedió a determinar el efecto de la concentración de MCM2 en la densidad óptica (DO) de ensayos de rojo oleoso. Como se mencionó previamente, el tratamiento con 30 mM de glucosa y 10 µg/mL de insulina incrementó en un 123.5 % el contenido de lípidos en comparación con los hepatocitos en glucosa estándar (5 mM) sin insulina; mientras que, la suplementación de RSV 10 µM disminuyó estadísticamente en un 50.7 % la densidad óptica del ensayo rojo oleoso con respecto a la de los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA, con valores similares al control (5 mM glucosa) (Figura 14A). Si bien los hepatocitos suplementados adicionalmente con 25 y 50 % de MCM2 mostraron valores significativamente menores a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (37.1 y 53.2 %, respectivamente), estas concentraciones no presentaron un efecto adicional al RSV; únicamente la concentración de 100 % de MCM2 disminuyó un 37.8 % adicional al efecto presentado con la suplementación con RSV 10 µM, inclusive con valores estadísticamente menores a los hepatocitos en glucosa estándar (5 mM).

Para confirmar estos resultados se llevó a cabo la cuantificación de TG y los resultados indican que las tres concentraciones de MCM2 disminuyeron estadísticamente y de manera dosis - dependiente la concentración de TG en los hepatocitos con alta glucosa e insulina (modelo *in vitro* de EHGNA) y suplementados con RSV 10 µM: 25 % MCM2 – 7.0 %, 50 % MCM2 – 23.1 % y 100 % MCM2 – 29.1 %. De manera similar a los resultados del ensayo de rojo oleoso, la concentración de 100 % de MCM2 disminuyó adicionalmente un 10.8 % el contenido de TG en comparación con el cultivo del modelo de EHGNA - 10 µM RSV logrando una

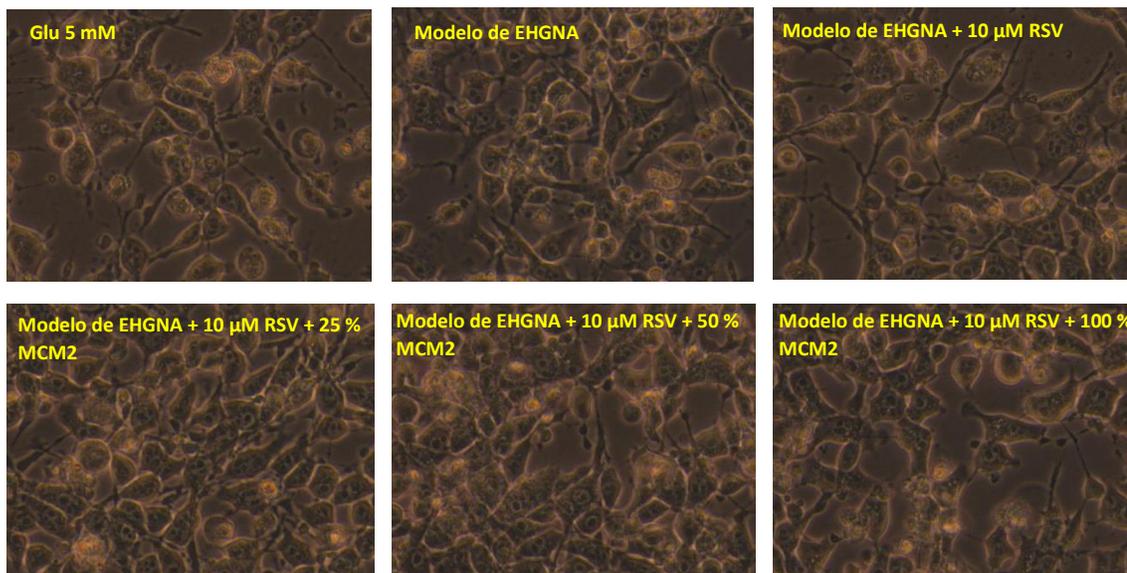
concentración similar a las células HepG2 control con glucosa estándar (Figura 14B).



**Figura 14.** Efecto de la adición de MCM2 en la concentración lipídica en las células HepG2 con alta glucosa (30 mM) e insulina (10 µg/mL) y suplementadas con RSV (10 µM). A) Densidad óptica mediante ensayos de rojo oleosos en células HepG2 y B) Cuantificación de TG totales en células HepG2. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM.

En la Figura 15 se presentan imágenes de cultivos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM y MCM2 (25, 50 y 100 %) utilizando un microscopio de fases (40 X). Se puede observar que, al agregar 100 % de MCM2 en los cultivos suplementados con 10 µM de RSV, las células presentan una dispersión y tamaño celular parecido a los hepatocitos con glucosa estándar (5 mM). Por lo anterior, con

estos resultados se proporciona evidencia por primera vez del efecto protector del MCM2 (100 %) en la acumulación de lípidos de las células esteatóticas suplementadas con RSV 10  $\mu$ M.



**Figura 15.** Captura de imágenes de células HepG2 en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con RSV y MCM2 a través de un microscopio de fases (40 X).

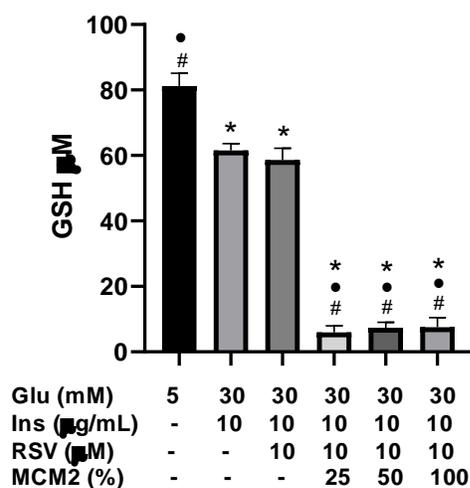
6.8. Efecto de la concentración del MCM2 sobre el estado redox del modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con RSV

6.8.1. Cuantificación de grupos tioles totales en el modelo *in vitro* de EHGNA

Como se comentó previamente, diversos estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* confirman que la EHGNA presenta bajos niveles de sistemas antioxidantes como el GSH. Por lo anterior, se realizó la cuantificación de GSH total en el modelo *in vitro* de EHGNA, así como en las células suplementadas con RSV (10  $\mu$ M) y MCM2 (25, 50 y 100 %). Al comparar los resultados con el control basal de hepatocitos (glucosa 5 mM), se puede observar una diferencia estadísticamente menor en el contenido

de GSH en el cultivo del modelo *in vitro* de EHGNA, así como en los hepatocitos suplementados con RSV (22.5 y 24.9 %, respectivamente). Inesperadamente, al agregar el MCM2 el contenido de GSH total tiene un decremento abrupto en los hepatocitos previamente suplementados con RSV (25 % MCM2 - 91.6 %, 50 % MCM2 - 90.8 % y 100 % MCM2 - 89.2 %) (Figura 16). Esto podría deberse a que los metabolitos producidos en el MCM2 provocan un desgaste más acelerado de GSH, dando como resultado el agotamiento de esta molécula endógena.

La acumulación de AG en el hígado provoca la sobreexpresión del citocromo P-450, una enzima que participa en la  $\beta$ -oxidación de AG de cadena larga; tanto la acumulación de AG como la  $\beta$ -oxidación promueven la producción de EROS, provocando así el consumo de moléculas antioxidantes como el GSH (Aguirre et al., 2014). En general, los resultados de la suplementación de RSV (10  $\mu$ M) y MCM2 indican que no hay un incremento en el contenido de GSH en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA.

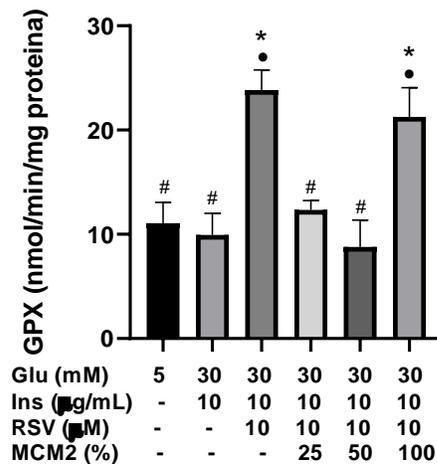


**Figura 16.** Efecto de la concentración de MCM2 en el contenido de glutatión (GSH) total en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM.

### 6.8.2. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en el modelo *in vitro* de EHGNA

Para continuar evaluando el efecto del RSV y el MCM2 sobre el estrés oxidativo en el modelo *in vitro* de EHGNA se procedió a medir la actividad de la enzima GPx, la cual tiene un papel importante en la peroxidación lipídica relacionada con EHGNA y la muerte celular asociada (Qui et al., 2019). De acuerdo a lo esperado, en la Figura 17 se observa un aumento significativo de la actividad enzimática de GPx del 115.6 % en los hepatocitos al suplementar con 10 µM de RSV y 92.2 % al añadir 100 % de MCM2, comparados con la actividad de GPx en los hepatocitos

control (glucosa 5 mM). Estos valores en la actividad de GPx incluso son mayores a los encontrados en el cultivo control. De manera similar, al hacer la comparación con el modelo *in vitro* de EHGNA se puede observar el aumento significativo de estos dos tratamientos, mostrando el efecto benéfico de la suplementación de RSV (10  $\mu$ M) y MCM2 (concentración 100 %) en la actividad enzimática de GPx en los hepatocitos en condiciones de EHGNA.

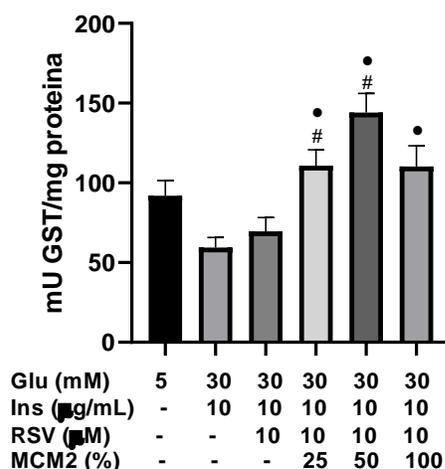


**Figura 17.** Efecto de la concentración de MCM2 en la actividad de la enzima GPX en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con 10  $\mu$ M de RSV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes ( $n = 3$ ). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo de EHGNA (30 mM glucosa – 10  $\mu$ g/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10  $\mu$ M.

### 6.8.3. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) en el modelo *in vitro* de EHGNA

De manera complementaria se midió la actividad enzimática de GST en las células HepG2, ya que en condiciones de EHGNA generalmente esta enzima se encuentra disminuida y lo anterior concuerda con los resultados obtenidos. En la Figura 18 se observa que, al agregar 30 mM de glucosa y 10 µg/mL de insulina (modelo *in vitro* de EHGNA), hay una disminución estadísticamente significativa del 35.3 % en la actividad de GST, en comparación con la actividad de los hepatocitos control (glucosa 5 mM). Al suplementar los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA con RSV (10 µM), la actividad de GST aumentó ligeramente (17.0 %) con respecto a la actividad de los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA. Sin embargo, la actividad de GST se presentó a niveles menores (24.31 %) de la actividad de los hepatocitos control (glucosa 5 mM).

Por el contrario, al añadir el MCM2 en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV se obtuvo un aumento significativo en la actividad enzimática de GST (25 % MCM2 - 20.5 %, 50 % MCM2 - 33.6 % y 100 % MCM2 - 20.05 %) con respecto a la actividad de GST en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA. Estos resultados muestran un efecto benéfico de la suplementación de MCM2 en el aumento de la actividad enzimática GST, promoviendo una disminución del estrés oxidativo presente en los hepatocitos en condiciones de EHGNA (Taroncher et al., 2022).

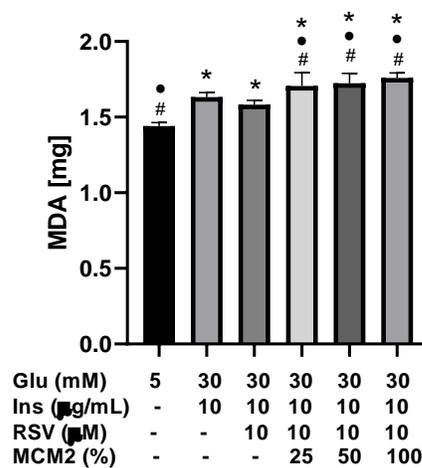


**Figura 18.** Efecto de la concentración de MCM2 en la actividad de la enzima GST en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM.

#### 6.8.4. Peroxidación lipídica a través del ensayo de TBARS en el modelo *in vitro* de EHGNA

La peroxidación de lípidos causa disfunción membranal y orgánica en los hepatocitos provocando el avance del deterioro patológico del hígado. El daño causa deformación morfológica de la mitocondria, provocando alteraciones en la cadena transportadora de electrones y, por lo tanto, una alta producción de EROS que a su vez aumenta el estrés oxidativo (Aguirre et al., 2014). Por lo anterior, se llevó a cabo la medición de MDA en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA mediante el ensayo de TBARS (Figura 19). Comparando con los valores de los hepatocitos control (glucosa 5 mM), las concentraciones de MDA fueron estadísticamente mayores (13.26 %) en los hepatocitos del modelo *in vitro* EHGNA

(30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). Contrario a lo esperado, se observó un aumento significativo en los niveles de MDA en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con 10 µM de RSV y MCM2 (25 % MCM2 – 8.3 %, 50 % MCM2 – 8.6 % y 100 % MCM2 – 11.2 %). Los resultados anteriores son relevantes ya que se ha reportado que la presencia constante de estrés oxidativo y peroxidación lipídica en las células HepG2 provocan alteraciones en la producción de colágeno y, a su vez, la progresión a fibrosis hepática y cirrosis (Aguirre et al., 2014).

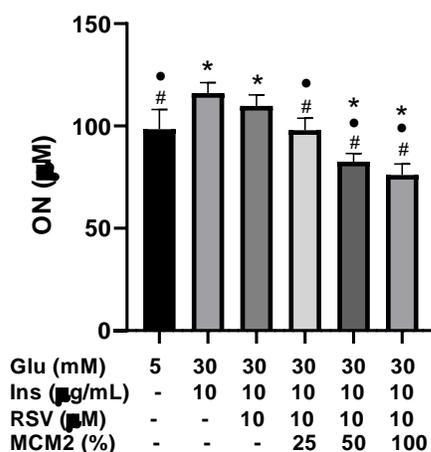


**Figura 19.** Efecto de la concentración de MCM2 en los niveles de peroxidación lipídica en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n=3). \* Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM.

## 6.9. Efecto de la concentración del MCM2 sobre el RSV en el nivel de inflamación del modelo *in vitro* de EHGNA

### 6.9.1. Marcadores de inflamación en modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con RSV y MCM2

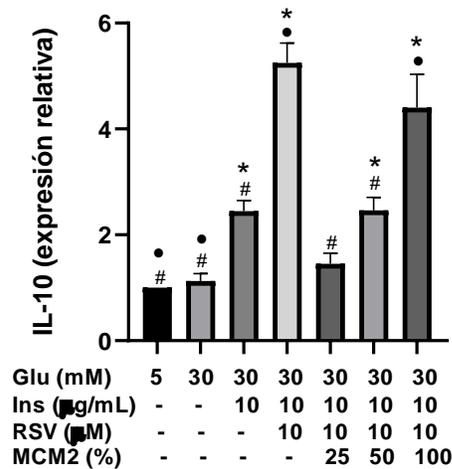
Para evaluar el efecto del RSV (10  $\mu$ M) y el MCM2 (25, 50 y 100 %) sobre el nivel de inflamación de los hepatocitos en un modelo *in vitro* de EHGNA se llevó a cabo el ensayo de Griess para la cuantificación de nitritos totales. En la Figura 20 se puede observar un aumento significativo en el contenido de nitritos (17.9 %) en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10  $\mu$ g/mL insulina), en comparación con el contenido en los hepatocitos control (glucosa 5 mM); sin embargo, se observa una disminución del 11.5 % en los hepatocitos suplementados con RSV en comparación con el contenido de nitritos totales en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10  $\mu$ g/mL insulina). Así mismo, se observa una disminución significativa dosis dependiente en el contenido de nitritos al agregar las diferentes concentraciones de MCM2 (25 % - 12.0 %, 50 % MCM2 – 27.7 % y 100% MCM2 – 34.3 %) con respecto al control contenido en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA, obteniendo valores similares (25 % MCM2) y estadísticamente menores (50 y 100 % MCM2) al contenido de nitritos en los hepatocitos control (glucosa 5 mM). Estos resultados demuestran el efecto antiinflamatorio del RSV, así como la contribución del MCM2 para disminuir el cuadro inflamatorio en una condición de EHGNA.



**Figura 20.** Efecto de la concentración de MCM2 en la inflamación medida con la concentración de óxido nítrico en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con 10 µM de RSV. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \*Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. •Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10 µM.

Con el objetivo de estudiar de forma preliminar esta condición antiinflamatoria en el modelo *in vitro* de EHGNA con la suplementación de RSV y MCM2, se llevó a cabo la determinación de la expresión de IL-10 por la técnica de qPCR en los diferentes cultivos bajo tratamiento. De acuerdo a la Figura 20, los resultados indican que la expresión relativa de la IL-10 de los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10 µg/mL insulina) aumentó significativamente (157.1 %) con respecto a la de los hepatocitos control (glucosa 5 mM). En comparación con la expresión de la IL-10 en los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA, al suplementar con 10 µM de RSV se puede observar un aumento significativamente estadístico de esta expresión (102.9 %) y 4.2 veces más con respecto a los hepatocitos en glucosa estándar (5 mM). Así mismo, al añadir 100 % de MCM2 se

puede observar un aumento importante de la expresión relativa de la IL-10 (178.6 %). Estos resultados, en complemento con la cuantificación de los nitritos totales en el modelo *in vitro* de EHGNA, podrían confirmar el efecto anti-inflamatorio que aporta la suplementación de 10  $\mu$ M de RSV y 100 % de MCM2.



**Figura 21.** Efecto de la concentración de MCM2 en la expresión de la IL-10 determinada con la técnica de qPCR en el modelo *in vitro* de EHGNA suplementado con 10  $\mu$ M de RSV. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 3). \*Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos control suplementados con glucosa 5 mM. • Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA (30 mM glucosa – 10  $\mu$ g/mL insulina). # Indica diferencia estadística con respecto a los hepatocitos del modelo *in vitro* de EHGNA suplementados con RSV 10  $\mu$ M.

## 7. CONCLUSIONES

A comparación de otros modelos *in vitro* previamente reportados, donde generalmente para lograr la acumulación de lípidos en células se utilizan concentraciones de ácidos grasos (ácido oléico y ácido palmítico), en este proyecto se obtuvo de manera novedosa el modelo *in vitro* a través de la suplementación HepG2 con glucosa alta (30 mM) e insulina (10 µg/mL).

A través de un modelo *in vitro* de EHGNA se pudieron identificar los parámetros propios de la enfermedad que se encuentran alterados como lo son: viabilidad celular a través de ensayos de MTT y BCA, acumulación lipídica por el ensayo de rojo oleoso e identificación de gotas lipídicas a través de microscopía, inflamación cuantificando ON y determinando marcadores pro-inflamatorios de EHGNA y estrés oxidativo por medio de la determinación de enzimas involucradas en la enfermedad (GSH, GPX, GST), así como la peroxidación lipídica a través del ensayo TBARS.

En este estudio se comprobaron los efectos protectores del resveratrol (RSV) en un modelo *in vitro* de EHGNA, obteniendo una atribución favorable con la suplementación de 10 µM al lograr una disminución significativa en la acumulación de lípidos (50.7 %), TG (20.5 %), así como en la inflamación (5.4 %), con el aumento en la actividad de las enzimas GPX (139.5 %) y GST (17 %).

Innovadoramente se demostró la capacidad de polarización de los macrófagos RAW264.7 de un fenotipo M1 pro-inflamatorio inducido con glucosa alta – LPS a M2 (anti-inflamatorio) a través de la suplementación de RSV (10 µM), confirmando su fenotipo anti-inflamatorio por los niveles bajos de IL-1 e IL-6 y niveles altos de Arg1 e IL-10 obtenidos por qPCR.

La adición de MCM2 a las células HepG2 del modelo *in vitro* de EHGNA previamente suplementadas con RSV mostró tener un efecto protector adicional en los niveles de inflamación (nivel de ON) y en el estado redox (actividad enzimática de GPx y GST) de los hepatocitos, particularmente a la concentración de 100 % de MCM2. Aunado a lo anterior, la adición de 100 % de MCM2 normalizó la concentración de

TG, logrando una disminución en la acumulación de lípidos en las células hepáticas. Si bien, las tres concentraciones evaluadas de MCM2 (25, 50 y 100 %) mostraron efectos positivos adicionales al tratamiento con RSV, la concentración de 100 % de MCM2 fue considerada la más óptima al mostrar su contribución a los tres objetivos evaluados en este proyecto: disminuir la acumulación lipídica en células HepG2, mejorar el estado redox y disminuir el proceso inflamatorio que se presenta en la EHGNA.

En general, estos resultados confirman el efecto protector del resveratrol sobre la acumulación de lípidos, el estado redox y anti-inflamatorio en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática suplementado con medio condicionado de macrófagos M2.

## 8. REFERENCIAS

- Aderem A & Ulevitch RJ. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406(6797): 782–787. <https://doi.org/10.1038/35021228>.
- Aguilera-Méndez A. (2018). Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 56(6): 544–549.
- Aguirre L, Portillo MP, Hijona E & Bujanda L. (2014). Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World Journal of Gastroenterology*. 20(23): 7366–7380. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7366>
- Alberdi G, Rodríguez VM, Macarulla MT, Miranda J, Churrua I & Portillo MP. (2013). Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition*. 29(3): 562–567. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.09.011>
- Alnahdi A, John A & Raza H. (2019). Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in hepg2 cells by palmitic acid. *Nutrients*. 11(9): 1979. <https://doi.org/10.3390/nu11091979>
- Atri C, Guerfali FZ & Laouini D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(6): 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M & Canbay A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*. 56(4): 952–964. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>.
- Biovision, 2021.
- Briseño P, Chávez-Pérez R & López-Zendejas M. (2019). Prevalence of hepatic steatosis and its relation to liver function tests and lipid profile in patients at medical check-up. Prevalencia y relación de esteatosis hepática con perfil lipídico y hepático en pacientes de chequeo médico. *Revista de Gastroenterología de México*. 84(3): 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.05.007>

Calabrese EJ, Mattson MP & Calabrese V. (2010). Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Human & Experimental Toxicology*. 29(12): 980–1015. <https://doi.org/10.1177/0960327110383625>

Chandrasekaran K, Swaminathan K, Chatterjee S & Dey A. (2010). Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. *Toxicology in vitro*. 24(2): 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.10.020>

Chen Z, Tian R, She Z, Cai J & Li H. (2020). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 152: 116–141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>

Chen S, Fuller KK, Dunlap JC & Loros JJ. (2020). A pro- and anti-inflammatory axis modulates the macrophage circadian clock. *Frontiers in Immunology*. 11: 867. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00867>

Cheng K, Song Z, Zhang H, Li S, Wang C, Zhang L & Wang T. (2019). The therapeutic effects of resveratrol on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice by improving oxidative stress, inflammation and lipid-related gene transcriptional expression. *Medical Molecular Morphology*. 52(4): 187–197. <https://doi.org/10.1007/s00795-019-00216-7>

Cisneros R, Oré R, Arnao I & Suárez S. (2011). Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii* walp). *Anales de la Facultad de Medicina*. 72(2): 107–111.

Da Rocha RF, De Bastiani MA & Klamt F. (2014). Bioinformatics approach to evaluate differential gene expression of M1/M2 macrophage phenotypes and antioxidant genes in atherosclerosis. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 70(2): 831–839. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9987-3>

Ding X, Jian T, Wu Y, Zuo Y, Li J, Lv H, Ma L, Ren B, Zhao L, Li W & Chen J. (2019). Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. *Biomedicine &*

Pharmacotherapy: Biomedecine & Pharmacotherapie. 110: 85–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.018>

Dayakar A, Chandrasekaran S, Kuchipudi SV & Kalangi SK. (2019). Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 10: 670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>

Dinarello CA. (2007). Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology*. 37 Suppl 1(Suppl 1): S34–S45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>

Dinarello CA. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 117(14): 3720–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>

Donato MT, Tolosa L & Gómez-Lechón MJ. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Methods in Molecular Biology*. 1250: 77–93. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5)

Dubuisson ML, de Wergifosse B, Trouet A, Baguet F, Marchand-Brynaert J & Rees JF. (2000) Antioxidative properties of natural coelenterazine and synthetic methyl coelenterazine in rat hepatocytes subjected to tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*. 60: 471–478. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00359-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00359-2)

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2021).

Faghihzadeh F, Adibi P, Rafiei R & Hekmatdoost A. (2014). Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research*. 34(10): 837–843. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.09.005>

Filella X, Molina R & Ballesta AM. (2002). Estructura y función de las citocinas. Servicio de bioquímica clínica. Centro de Diagnóstico Biomédico Hospitalario Clínico. 39(2): 63–71.

Forcina L, Miano C, Scicchitano BM, Rizzuto E, Berardinelli MG, De Benedetti F, Pelosi L & Musarò A. (2019). Increased circulating levels of interleukin-6 affect the redox balance in skeletal muscle. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019: 3018584. <https://doi.org/10.1155/2019/3018584>

García-Monzón C, Lo Iacono O, Mayoral R, González-Rodríguez A, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Pozo L, Vargas-Castrillón J, Casado M, Boscá L, Valverde AM & Martín-Sanz P. (2011). Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 54(1): 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.021>

Gnoni GV & Paglialonga G. (2009). Resveratrol inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat hepatocytes. *European Journal of Clinical Investigation*. 39: 211–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362>.

Gómez S, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, Milagro F, Martínez JA & Portillo MP. (2012). Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *The British Journal of Nutrition*. 107(2): 202–210. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002753>

Gorgani-Firuzjaee S & Reza M. (2015). SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) inhibition ameliorates high glucose-induced de-novo lipogenesis and VLDL production through regulating AMPK/mTOR/SREBP1 pathway and ROS production in HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. (89): 679–689. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.036>

Habig WH, Pabst MJ & Jakoby WB. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130–7139.

Hajighasem A, Farzanegi P & Mazaheri Z. (2018). Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and

inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 125(2): 142–149. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1441872>

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G & Schaper F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 1): 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>

Hosseini H, Teimouri M, Shabani M, Koushki M, Babaei Khorzoughi R, Namvarjah F, Izadi P & Meshkani R. (2020). Resveratrol alleviates non-alcoholic fatty liver disease through epigenetic modification of the Nrf2 signaling pathway. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 119: 105667. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.10566>

Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, Lan F, Walsh K, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA & Zang M. (2008). SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(29): 20015–20026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802187200>

Idilman IS, Ozdeniz I & Karcaaltincaba M. (2016). Hepatic steatosis: etiology, patterns, and quantification. *Seminars in Ultrasound, CT, and MR*. 37(6): 501–510. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2016.08.003>

Ipsen DH, Lykkesfeldt J & Tveden-Nyborg P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75(18): 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>

Irie M, Sohda T, Anan A, Fukunaga A, Takata K, Tanaka T, Yokoyama K, Morihara D, Takeyama Y, Shakado S & Sakisaka S. (2016). Reduced glutathione suppresses oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology*. 6(1): 13–18. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1159>

Izdebska M, Herbet M, Gawrońska-Grzywacz M, Piątkowska-Chmiel I, Korga A, Sysa M, Iwan M, Natorska-Chomicka D, Poleszak E, Wróbel A, Mandziuk S & Dudka

- J. (2018). Resveratrol limits lipogenesis and enhance mitochondrial activity in HepG2 cells. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical*. 21(1): 504–515. <https://doi.org/10.18433/jpps29994>
- Jin SH, Yang JH, Shin BY, Seo K, Shin SM, Cho IJ & Ki SH. (2013). Resveratrol inhibits LXR $\alpha$ -dependent hepatic lipogenesis through novel antioxidant Sestrin2 gene induction. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 271(1): 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.04.023>
- Kaplowitz N. (2000). Mechanisms of liver cell injury. *Journal of Hepatology*. 32(1): 39–47. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)80414-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)80414-6)
- Kawase A., Takashima O, Tanaka S, Shimada H & Iwaki M. (2022). Diclofenac-induced cytotoxicity in direct and indirect co-culture of HepG2 cells with differentiated THP-1 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(15): 8660. <https://doi.org/10.3390/ijms23158660>
- Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW & Chae HJ. (2010). Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 32(2): 251–257. <https://doi.org/10.3109/08923970903252220>
- Krenkel O y Tacke F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews. Immunology*. 17(5): 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H & Moilanen E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*. 4(4): 471–479. <https://doi.org/10.2174/1568010054526359>
- Koushki M, Zare M, Shabani M, Teimouri M, Hosseini H, Babaei Khorzoughi R & Meshkani R. (2020). Resveratrol reduces lipid accumulation through upregulating the expression of microRNAs regulating fatty acid beta oxidation in liver cells: evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 19(2): 333–340. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.111745.13332>

- Kumar P, Nagarajan A & Uchil PD. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018(6). <https://doi:10.1101/pdb.prot095505>.
- Kumar A, Sharma A, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, Kohli KK & Bhansali A. (2013). Patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) have higher oxidative stress in comparison to chronic viral hepatitis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 3(1): 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2012.10.009>
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM & Li HB. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 6(12): 6020–6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- Li Y, Feng L, Li G, An J, Zhang S, Li J, Liu J, Ren J, Yang L & Qi Z. (2020). Resveratrol prevents ISO-induced myocardial remodeling associated with regulating polarization of macrophages through VEGF-B/AMPK/NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*. 84: 106–508. <https://doi: 10.1016/j.intimp.2020.106508>.
- Lirussi, F., Azzalini, L., Orlando, S., Orlando, R., & Angelico, F. (2007). Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(1): 49–96. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004996.pub3>
- Lloren R, Majeed I, Martínez A, Arteaga I & Pere M. (2017). Esteatosis hepática: diagnóstico y seguimiento. *Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. 24(7): 378–389. <https://doi: 10.1016/j.fmc.2017.03.001>
- Malik SA, Acharya JD, Mehendale NK, Kamat SS, Ghaskadbi SS. (2019). Pterostilbene reverses palmitic acid mediated insulin resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation. *Free Radical Research*. 53(7): 815–827. <https://doi: 10.1080/10715762.2019.1635252>.
- Manne V, Handa P & Kowdley KV. (2018). Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*. 22(1): 23–37. <https://doi:10.1016/j.cld.2017.08.007>

Melino M, Gadd VL, Walker GV, Skoien R, Barrie HD, Jothimani D, Horsfall L, Jones A, Sweet MJ, Thomas GP, Clouston AD, Jonsson JR & Powell EE. (2012). Macrophage secretory products induce an inflammatory phenotype in hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology*. 18(15): 1732–1744. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i15.1732>

Muntané J, González R, Ranchal I, Collado JA, López-Sánchez LM, Herencia C, Rodríguez-Ariza A, Muñoz-Castañeda JR & de la Mata M. (2007). Mecanismos de lesión hepatocelular. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 99(7): 405–410.

Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, Federico A & Persico M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. 9547613 <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Nawaz W, Zhou Z, Deng S, Ma X, Ma X, Li C & Shu X. (2017). Therapeutic versatility of resveratrol derivatives. *Nutrients*. 9(11): 1188. <https://doi.org/10.3390/nu9111188>

Núñez AJ. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*. 37(5): 644–660.

Oh H, Park SH, Kang MK, Kim YH, Lee EJ, Kim DY, Kim SI, Oh S, Lim SS & Kang YH. (2019). Asaronic acid attenuates macrophage activation toward M1 phenotype through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway and JAK-STAT signaling in glucose-loaded murine macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(36): 10069–10078. doi: 10.1021/acs.jafc.9b03926.

Ohtsu A, Shibutani Y, Seno K, Iwata H, Kuwayama T & Shirasuna K. (2017). Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6

secretion via the RAGE/TLR4-NF- $\kappa$ B-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14(5): 4363–4370. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5045>

Paglia DE & Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70(1): 158–169.

Padberg F, Höper T, Henkel S, Driesch D, Luch A & Zellmer S. (2021). Novel indirect co-culture of immortalised hepatocytes with monocyte derived macrophages is characterised by pro-inflammatory cytokine networks. *Toxicology in vitro*. 73: 105134. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105134>

Pan QR, Ren YL, Liu WX, Hu YJ, Zheng JS, Xu Y & Wang G. (2015). Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. *Nutrition Research*. 35(7): 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.05.006>

Palmeira CM, Rolo AP, Berthiaume J, Bjork JA & Wallace KB. (2007). Hyperglycemia decreases mitochondrial function: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 225(2): 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.07.015>

Pardo V, Gonzalez-Rodriguez A, Muntane J, Kozma SC & Valverde AM. (2015). Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food and Chemical Toxicology*. 80: 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.029>

Pérez A, Rodríguez A, Sanjurjo VM & Padrón R. (1997). El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*. 34(2): 84–86.

Pfaffenbach KT, Gentile CL, Nivala AM, Wang D, Wei Y & Pagliassotti MJ. (2010). Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP

homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 298(5): 1027–1035. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2009>

Powell EE, Wong VW & Rinella M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet*. 397(10290): 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32511-3)

Qi J, Kim JW, Zhou Z, Lim CW & Kim B. (2020). Ferroptosis affects the progression of nonalcoholic steatohepatitis via the modulation of lipid peroxidation-mediated cell death in mice. *The American Journal of Pathology*. 190(1): 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.09.011>

Qi R, Lei CG, Bai YX & Xing X. (2018). Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese Journal of Hepatology. 26(8): 601–606. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2018.08.008>

Quiñones M, Miguel M & Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1): 76–89.

Qureshi AA, Guan XQ, Reis JC, Papasian CJ, Jabre S, Morrison DC & Qureshi N. (2012). Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. *Lipids and Health Disease*. 11: 76. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-76>

Rada E, Marzal M, Aranzazu N & Convit, J. (2003). Incremento de óxido nítrico en el suero y sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes con la enfermedad de Hansen en estado reaccional tipo II. *Investigación Clínica*. 44(2): 129–136.

Rada P, González-Rodríguez Á, García-Monzón C & Valverde ÁM. (2020). Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death & Disease*. 11(9): 802. <https://doi:10.1038/s41419-020-03003-w>

Tian R, Geng Y, Yang Y, Seim I & Yang G. (2021). Oxidative stress drives divergent evolution of the glutathione peroxidase (GPX) gene family in mammals. *Integrative Zoology*. 16(5): 696–711. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12521>

Saleh HA, Yousef MH & Abdelnaser A. (2021). The anti-inflammatory properties of phytochemicals and their effects on epigenetic mechanisms involved in TLR4/NF- $\kappa$ B-mediated inflammation. *Frontiers in Immunology*. 12: 606069. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.606069>

Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H. (2008). Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacologica Sinica*. 29: 698–706. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00807>.

Sharma RS, Harrison DJ, Kisielewski D, Cassidy DM, McNeilly AD, Gallagher JR, Walsh SV, Honda T, McCrimmon RJ, Dinkova-Kostova AT, Ashford M, Dillon JF & Hayes JD. (2017). Experimental nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis are ameliorated by pharmacologic activation of Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2). *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 5(3): 367–398. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.016>

Semnani-Azad Z, Blanco S, Connelly PW, Bazinet RP, Retnakaran R, Jenkins DJ, Harris SB & Hanley AJ. (2021). The association of soluble CD163, a novel biomarker of macrophage activation, with type 2 diabetes mellitus and its underlying physiological disorders: A systematic review. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 22(9) <https://doi.org/10.1111/obr.13257>

Serviddio G, Bellanti F, Sastre J, Vendemiale G & Altomare E. (2010). Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 17(22): 2325–2337. <https://doi.org/10.2174/092986710791698530>

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

Smoliga J y Blanchard OL. (2017). Allometric scaling models: history, use, and misuse in translating resveratrol from basic science to human clinical applications. *Functional Foods in Health and Disease*. 7: 338–352. <https://doi.org/10.31989/FFHD.V7I5.345>

Stervbo U, Vang O & Bonnesen C. (2006). Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. *Cell Proliferation*. 39(6): 479–493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2006.00406.x>

Suurmond CE, Lasli S, van den Dolder FW, Ung A, Kim HJ, Bandaru P, Lee K, Cho HJ, Ahadian S, Ashammakhi N, Dokmeci MR, Lee J & Khademhosseini A. (2019). *In vitro* human liver model of nonalcoholic steatohepatitis by coculturing hepatocytes, endothelial cells, and Kupffer cells. *Advanced Healthcare Materials*. 8(24). <https://doi.org/10.1002/adhm.201901379>

Svegliati-Baroni G, Pierantonelli I, Torquato P, Marinelli R, Ferreri C, Chatgililoglu C, Bartolini D & Galli F. (2019). Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 144: 293–309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.02>

Taroncher M, Halbig F, Rodríguez-Carrasco Y & Ruiz MJ. (2022). Stressful effects of T-2 metabolites and defense capability of HepG2 cells. *Toxins*. 14(12): 841. <https://doi.org/10.3390/toxins14120841>

Tilg H y Diehl AM. (2000). Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine*. 343(20): 1467–1476. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011163432007>

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

Tietze F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*. 27(3): 502–522. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5)

Valenzuela C, Castillo V, Ronco AM, Aguirre C, Hirsch S & Llanos M. (2014). Sistema endocanabinoide y desarrollo de esteatosis hepática. *Revista Médica de Chile*. 142(3): 353–360.

Wang L, Zhao H, Wang L, Tao Y, Du G, Guan W, Liu J, Brennan C, Ho CT, Li S. (2020). Effects of selected resveratrol analogues on activation and polarization of lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(12): 3750–3757. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00498>

Wang YM, Liu HX & Fang NY. (2019). High glucose concentration impairs 5-PAHSA activity by inhibiting AMP-activated protein kinase activation and promoting nuclear factor-Kappa-B-mediated inflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 9: 1491. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01491>

Wei H, Li B, Sun A & Guo F. (2019). Interleukin-10 family cytokines immunobiology and structure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1172: 79–96. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9_4)

Xia N, Daiber A, Forstermann U & Li H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*. 174: 1633–1646. <https://doi.org/10.1111/bph.13492>

Yu B, Qin SY, Hu BL, Qin QY, Jiang HX, Luo W. (2019). Resveratrol improves CCL4-induced liver fibrosis in mouse by upregulating endogenous IL-10 to reprogramme macrophages phenotype from M(LPS) to M(IL-4). *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 117: 109110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109110>

Yue S, Yu J, Kong Y, Chen H, Mao M, Ji C, Shao S, Zhu J, Gu J & Zhao, M. (2019). Metabolomic modulations of HepG2 cells exposed to bisphenol analogues. *Environment International*. 129: 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.008>

Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB & Cohen RA. (2004). AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 279(46): 47898–47905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408149200>

Zelber-Sagi S, Ratziu V & Oren R. (2011). Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology*. 17(29): 3377–3389. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i29.3377>

Zhang Y, Chen ML, Zhou Y, Yi L, Gao YX, Ran L, Chen SH, Zhang T, Zhou X, Zou D, Wu B, Wu Y, Chang H, Zhu JD, Zhang QY & Mi MT. (2015). Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*. 59(8): 1443–1457. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500016>