



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ROL PROTECTOR DE NRF2 EN CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS  
FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR PALMITATO *IN VITRO***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: GIORGIO CABRERA SEPÚLVEDA  
PROFESOR GUIA: DR. TM. SERGIO WEHINGER W.**

**TALCA-CHILE**

**2019**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a mi familia por ser mi sostén durante todo este tiempo, a mis profesores por guiarme en la investigación, enseñarme a realizar los procedimientos y darme la posibilidad de aprender nuevas habilidades que fortalecen mi perfil profesional y a mis compañeros que compartieron su experiencia y de una u otra forma ayudaron en la realización de esta memoria.

## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) .....	9
2.2. Alimentación y DMT2.....	10
2.3. Ejercicio físico y DMT2.....	10
2.4. Célula beta pancreática.....	11
2.5. Células beta en cultivos celulares.....	12
2.6. Alteraciones estructurales de célula beta en DM.....	12
2.7. Estrés oxidativo y antioxidantes.....	13
2.8. Especies Reactivas del Oxígeno en diabetes .....	14
2.9. Otras vías productoras de ROS.....	14
2.10. Glucolipotoxicidad en células beta.....	15
2.11. Disfunción de célula beta y Sistema Ubiquitin-Proteasoma.....	16
2.12. Palmitato.....	17
2.13. Ácido oleico.....	18
2.14. Efectos del ácido oleico en las células.....	18
2.15. Vía de señalización Nrf2.....	19
2.16. Elementos de respuesta antioxidante.....	21
2.16.1 Hemo oxigenasa-1.....	21
2.16.2 NADPH quinina oxidoreductasa 1.....	22
2.17. Activadores de Nrf2.....	23
2.17.1. Ter-Butil-Hidroquinona.....	23
2.17.2. Ter-butil-hidroquinona y diabetes.....	24
2.17.3. Flavonoides.....	25
2.17.4. Clasificación de los flavonoides.....	25
2.17.5. Quercetina.....	26
2.17.6. Quercetina como suplemento alimenticio.....	26
2.17.7. Potencial antidiabético de Quercetina.....	27
2.17.8. Quercetina en ensayo MTT.....	28

<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Objetivos específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Reactivos.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2. Cultivo celular.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3. Cambio de medio y lavado.....</b>	<b>31</b>
<b>5.4. Tripsinización de células.....</b>	<b>31</b>
<b>5.5. Medición de la expresión de elementos de respuesta antioxidante.....</b>	<b>32</b>
<b>5.6. Comparación relativa de la expresión de ERA.....</b>	<b>33</b>
<b>5.7. Estudio de viabilidad celular con activadores de Nrf2.....</b>	<b>34</b>
<b>5.8. Análisis estadístico.....</b>	<b>35</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1. Estudio de viabilidad celular con activadores de Nrf2.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1.1. Viabilidad de células Min6 con Quercetina.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1.2. Viabilidad de células Min6 con t-BHQ.....</b>	<b>37</b>
<b>6.2. Estudio de expresión de elementos de respuesta antioxidante.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2.1. Expresión de ARN: 18s rRNA.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2.2. Expresión de ARN: Nrf2.....</b>	<b>39</b>
<b>6.2.3. Expresión de ARN: Hmox-1.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2.4. Expresión de ARN: SOD-1.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2.5. Expresión de ARN: Prdx-1.....</b>	<b>42</b>
<b>6.3. Estudio del efecto protector de activadores de Nrf2 en células Min6 con palmitato</b>	
<b>6.3.1. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de quercetina y palmitato.....</b>	<b>43</b>
<b>6.3.2. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de t-BHQ y palmitato.....</b>	<b>44</b>
<b>6.4. Estudio del efecto protector de activadores de Nrf2 en células Min6 con ácido oleico</b>	
<b>6.4.1. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de quercetina y á. oleico.....</b>	<b>45</b>
<b>6.4.2. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de t-BHQ y á. oleico.....</b>	<b>46</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS:

Tabla 1. Listado de primers.....	33
----------------------------------	----

### FIGURAS:

Figura 1: Vía de señalización de Nrf2-Keap1.....	20
Figura 2: Gráfico viabilidad células Min6 con quercetina.....	36
Figura 3: Gráfico viabilidad células Min6 con t-BHQ.....	37
Figura 4: Resultados RT-qPCR para 18s rRNA.....	38
Figura 5: Resultados RT-qPCR para ARNm NRF2.....	39
Figura 6: Resultados RT-qPCR para ARNm Hmox-1.....	40
Figura 7: Resultados RT-qPCR para ARNm SOD-1.....	41
Figura 8: Resultados RT-qPCR para ARNm Prdx-1.....	42
Figura 9: Gráfico viabilidad de células Min6 con quercetina y palmitato.....	43
Figura 10: Gráfico viabilidad de células Min6 con t-BHQ y palmitato.....	44
Figura 11: Gráfico viabilidad de células Min6 con quercetina y á. oleico.....	45
Figura 12: Gráfico viabilidad de células Min6 con t-BHQ y á. oleico.....	46

## RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica muy importante a nivel mundial por sus complicaciones tales como: enfermedades cardíacas, ceguera y amputaciones. Se caracteriza por presentar resistencia a la insulina con posterior pérdida de masa de células beta pancreáticas, las cuales son las encargadas de secretar la insulina en el páncreas. Esta pérdida ocurre por el aumento de la concentración de los radicales libres en el órgano secretor, debido a una disregulación de la glicemia y ácidos grasos libres en el plasma. Estos provocan estrés oxidativo en las células beta pancreáticas disminuyendo su viabilidad.

Por otra parte, existe un regulador maestro de la respuesta antioxidante en todas las células del organismo, el cual es llamado Nrf2, este es un factor de transcripción presente normalmente en el citoplasma, pero bajo un estímulo oxidativo por parte de radicales libres, es translocado al núcleo celular aumentando la expresión de elementos de respuesta antioxidantes.

En este estudio se propuso aumentar la capacidad antioxidante de las células beta pancreáticas murinas MIN6 frente a daño oxidativo por palmitato, el ácido graso saturado más frecuente en el organismo, con ayuda de los activadores de Nrf2, ter-butil-hidroquinona (t-BHQ) y quercetina.

Los resultados indicaron que existe activación de la vía Nrf2 en células MIN6 por parte de t-BHQ demostrado como un aumento en la expresión de elementos de respuesta antioxidante, pero esto no ocurrió igualmente en las células tratadas con quercetina, además el tratamiento de t-BHQ en células con estrés por palmitato no generó recuperación de su viabilidad, lo mismo ocurrió con el tratamiento de quercetina. Por lo tanto, se concluye que la activación de la vía Nrf2 no genera un efecto protector en células MIN6 bajo daño citotóxico inducido por palmitato, además la quercetina no activa la vía Nrf2 en células MIN6.

**Palabras clave:** diabetes, célula beta pancreática, estrés oxidativo, palmitato, vía nrf2, efecto protector.

## 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica de gran importancia a nivel mundial, en los últimos 30 años el número de personas afectadas se ha cuadruplicado, y en 2015, uno de cada once adultos fueron diagnosticados con esta enfermedad en todo el mundo, cifra que según estudios, seguirá aumentando cada año, siendo la DM tipo 2 la forma más prevalente (1). En este contexto, es importante destacar a la DM tipo 2, caracterizada por una disfunción y posterior pérdida progresiva de células beta, las cuales están ubicadas en los islotes de Langerhans del páncreas, provocando así una deficiencia en la secreción de insulina, hormona necesaria para mantener la homeostasis metabólica en el cuerpo. Estudios han postulado que la pérdida celular es ocasionada por la baja capacidad antioxidante que presentan las células beta, en comparación con células de otros tejidos, siendo así más susceptibles a sufrir daño por estrés oxidativo (2).

El estrés oxidativo se origina cuando hay un desbalance entre sustancias oxidantes y sustancias antioxidantes al interior de una célula. Dentro de las sustancias oxidantes están las especies reactivas del oxígeno (ERO) que son productos de la reducción incompleta del oxígeno y también están las especies reactivas del nitrógeno (ERN) destacando el radical óxido nítrico. A su vez, existen dos factores clave que generan estrés oxidativo en células beta de pacientes diabéticos, el primero es la glucotoxicidad producida por elevados niveles de glucosa en la sangre, incrementando así los niveles de EROs en la célula. El segundo factor clave es la lipotoxicidad producida por elevados niveles de ácidos grasos en la sangre, induciendo acumulación de malonil-CoA, incremento de oxidación de ácidos grasos (lipoperoxidación) y apoptosis inducida por ácidos grasos (3).

Actualmente, uno de los principales enfoques para combatir la DM tipo 2, se basa en mejorar la capacidad antioxidante que poseen las células beta pancreáticas, por esta razón, existe un factor de transcripción que ha despertado el interés de la comunidad científica en



esta área, el cual es llamado Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, por sus siglas en inglés) considerado como un regulador maestro de la respuesta antioxidante (4).

El Nrf2 es un factor de transcripción que, en condiciones fisiológicas normales, está unido a una proteína llamada Keap1, siendo constantemente ubiquitinizado para luego ser degradado en el proteosoma. Cuando la célula es afectada por estrés oxidativo, los radicales libres interaccionan con Keap1 provocando la liberación de Nrf2, el cual es translocado al interior del núcleo celular donde incrementa la transcripción de genes que codifican enzimas antioxidantes como, por ejemplo: *Hmox-1*, *NQO1*, *GST*, entre otras. Debido al amplio rango de enzimas antioxidantes que se producen por la activación de Nrf2, se han buscado diversas moléculas que actúen como activadores del factor de transcripción y así combatir el estrés oxidativo en múltiples tipos celulares (5).

Uno de los activadores de Nrf2 es ter-butil-hidroquinona (t-BHQ), el cual corresponde a un compuesto fenólico usado durante muchos años para prevenir la oxidación de productos alimenticios estabilizando así su color, sabor y valor nutricional (6). Por otra parte, un activador menos estudiado es la quercetina, el cual es un flavonoide encontrado en múltiples vegetales, y estudios demuestran que activa la vía Nrf2 en hepatocitos, pero no existen estudios donde activen la vía Nrf2 en células beta pancreáticas (7).

Por lo tanto, en este estudio se evaluó el rol protector de la activación de Nrf2 en células beta pancreáticas MIN6 tratadas con palmitato para inducir estrés oxidativo por ácidos grasos, utilizando dos activadores de Nrf2, t-BHQ y Quercetina. En primera instancia se evaluó la concentración de t-BHQ y de Quercetina en donde no genere daño en las células MIN6 mediante MTT, luego se evaluó su activación de la vía Nrf2 midiendo la expresión de elementos de respuesta antioxidante por RT-qPCR y finalmente por MTT se evaluó si protegían a las células MIN6 tratadas con palmitato y ácido oleico.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)

La DMT2 es una enfermedad metabólica crónica, no transmisible, generada por múltiples factores como, por ejemplo, la genética propia del individuo y su estilo de vida. Los pacientes que padecen esta enfermedad no responden a los estímulos que genera la insulina, lo que se traduce en una resistencia a esta hormona, posteriormente se genera una disminución de su secreción, producto de la disminución y disfunción de las células beta pancreáticas. Todo esto tiene como consecuencia un incremento en los niveles de glucosa en la sangre que genera un amplio rango de complicaciones. (8)

Otros cambios metabólicos ocurridos en la DMT2, además de la hiperglicemia incluyen: daño en la función de células endoteliales, inflamación crónica, incremento de ácidos grasos, cambios en trombosis y fibrinólisis. Por este motivo, individuos con DMT2 tienen mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como, por ejemplo: infartos, nefropatías, neuropatías y retinopatías. Y dentro de las diferentes complicaciones se encuentran: ceguera, amputaciones, infecciones, etc. (9)

La Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) estimó que uno de cada 11 adultos en el mundo (415 millones de adultos) padecían diabetes en el año 2015 y se estima que para el año 2040 esta enfermedad afectará a 642 millones de personas. La razón de este aumento progresivo se debe a múltiples factores que incluyen el envejecimiento de la población, el desarrollo económico, urbanización, malos hábitos alimenticios y estilos de vida sedentarios. Así también, en el año 2013 la diabetes fue considerada la novena causa mayor de reducción en la expectativa de vida en el mundo. (1)

## **2.2. Alimentación y DMT2**

Uno de los factores más relevantes en la etiología de la diabetes mellitus tipo 2 en la población es la alimentación, ámbito bastante complejo, ya que generalmente, se relaciona con la situación socioeconómica de los individuos. Una dieta alta en grasas y carbohidratos genera obesidad, la cual contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Actualmente se sabe que el consumo de granos, vegetales, frutas y lácteos, además del no consumo de carnes rojas, procesadas y huevos, se asocian con un 81% de reducción del riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2. Esto se puede explicar debido a la baja cantidad de grasas que contienen estos alimentos, disminuyendo así el riesgo de obesidad, además las frutas, verduras y granos contienen diversos componentes químicos que pueden contribuir en la respuesta antioxidante de las células beta pancreáticas. (10)

## **2.3. Ejercicio físico y DMT2**

La obesidad se considera un factor determinante en la etiología de la diabetes mellitus, esta es producida por una mala alimentación y falta de ejercicio, por ello, combatir la obesidad se considera un tratamiento para disminuir la patología de la diabetes mellitus tipo 2. Existen diversos tipos de ejercicios como, por ejemplo, los aeróbicos, de resistencia, combinados, yoga, anaeróbicos, etc. Estudios han demostrado que los ejercicios aeróbicos son seguros y efectivos para mejorar la calidad de vida de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya que estos muestran estabilidad médica, es decir, no se desarrollaron las complicaciones comunes de la diabetes. Por otra parte, los efectos de los ejercicios de resistencia y ejercicios combinados han mostrado resultados mixtos. (11)

## 2.4. Célula beta pancreática

La célula beta pancreática es la principal célula presente en los islotes de Langerhans del páncreas, es una célula endocrina esencial cuya función principal es producir, almacenar y secretar insulina en respuesta a nutrientes, hormonas y estímulos nerviosos, para mantener los niveles de glucosa sanguínea en el rango óptimo para el funcionamiento de todos los tejidos del organismo. Debido a la arquitectura de la célula beta, también tiene una función paracrina/autocrina con sus células vecinas. (12)

El mecanismo de acción por el cual la célula beta secreta glucosa comienza en la membrana plasmática, en donde un transportador de glucosa Glut2, facilitará el ingreso de glucosa al citoplasma de la célula beta, este carbohidrato será metabolizado aumentando los niveles de ATP intracelulares, lo cual favorecerá la fosforilación de diversas proteínas que tendrán como objetivo, incrementar los niveles de calcio intracelular, cuya función será translocar las vesículas que contienen insulina hacia la membrana y así liberar la hormona. (13)

La masa de células beta no puede ser medida directamente y de forma no invasiva en humanos *in vivo*, por ello necesariamente los estudios de medición de masa de células beta pancreáticas se realizan en autopsias. En individuos normales la masa de células beta es de 0,8 g en promedio. Estos estudios han reportado que existe una disminución de la masa de células beta que va desde un 0 a un 65% en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, cifra que aumenta a un 70 – 100% en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (14). En etapas tempranas de la diabetes mellitus, las células beta pancreáticas se adaptan a la resistencia a la insulina, incrementando su masa y función gracias a factores de crecimiento como prolactina, lactógeno placentario y hormona del crecimiento. Como el exceso de nutrientes persiste, la hiperglicemia y los ácidos grasos afectan negativamente la función de la célula beta, ya que se generan especies reactivas de oxígeno, alterando vías metabólicas e incrementando el calcio intracelular (15).

## **2.5. Células beta en cultivos celulares**

Las células beta pancreáticas han sido ampliamente utilizadas en estudios *in vitro* a lo largo de los años, para ello principalmente destacan las líneas celulares murinas y humanas. Estas líneas celulares provienen de tumores por lo cual tienen diferencias con las células normales, la principal es que las células normales no pueden dividirse indefinidamente como las células tumorales. Además, extraer las células beta desde tejido pancreático es complicado y pueden mezclarse con otras células pancreáticas, y en un cultivo celular estas se vuelven viejas por lo tanto pierden algunas características. Pero las células tumorales también pueden tener algunas desventajas como, por ejemplo, estar en diferentes estados del ciclo celular lo cual puede afectar ciertas características como la sensibilidad a la glucosa en comparación con las células normales, pero en cambio son más fáciles de manejar en estudios *in vitro* ya que pueden dividirse indefinidamente. (16)

## **2.6. Alteraciones estructurales de célula beta en DM**

Debido a las diferentes condiciones generadas por la diabetes mellitus tipo 2, se generan alteraciones cuantitativas y cualitativas de la célula beta, una de las alteraciones cualitativas que se ha estudiado es la disminución en la densidad de las mitocondrias, la cual se puede considerar como un proceso adaptativo debido a las condiciones adversas, como el estrés oxidativo. Este estrés además puede generar daño en el retículo endoplasmático que forma parte de la síntesis de proteínas, proceso que es de suma importancia en las células beta debido a su función de síntesis de insulina, por lo tanto, el aumento de la demanda de insulina por la resistencia a esta hormona y el aumento de ácidos grasos puede contribuir a la disfunción de la célula. (17)

## 2.7. Estrés oxidativo y antioxidantes

El oxígeno es un elemento químico altamente oxidativo, pero los organismos aeróbicos pueden sobrevivir a su presencia y utilizarlo como parte de sus procesos de generación de energía gracias a que poseen múltiples mecanismos de defensa antioxidantes. Los mecanismos de defensa pueden sintetizarse *in vivo*, como el glutatión (GSH), o pueden consumirse en alimentos como los polifenoles o flavonoides que forman parte de frutas y verduras. El término antioxidante puede definirse como “cualquier sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, disminuye significativamente la oxidación de ese sustrato” o también puede definirse como “cualquier sustancia que disminuye, previene o remueve el daño oxidativo de una molécula específica”. (18)

En organismos aeróbicos normales, la producción de especies reactivas está en constante equilibrio con los sistemas de defensa antioxidante, es decir, estos sistemas en vez de eliminar por completo las especies reactivas, las estabiliza. Pero mantener los sistemas de defensa requiere gran cantidad de energía, por lo tanto, las células que utilizan su energía para mantener otros procesos, como las células beta pancreáticas, las cuales están sintetizando y secretando insulina periódicamente, tienen sistemas de defensa menos eficientes. (19)

El término estrés oxidativo se refiere a un serio desbalance entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes, por lo tanto, puede ocurrir cuando hay una sobreproducción de especies reactivas o cuando hay una disminución de las defensas antioxidantes. El daño generado por las especies reactivas se genera cuando estas interactúan con biomoléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, afectando su estructura química y, por ende, su función. Algunas de las consecuencias del desbalance redox son lipoperoxidación, oxidación de proteínas, daño al ADN e interferencia de especies reactivas con señales intracelulares. (18)

## **2.8. Especies Reactivas del Oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles) en diabetes**

Una de las causas del estrés oxidativo que sufren las células beta pancreáticas en diabetes es la gran cantidad de especies reactivas del oxígeno que se generan, esto se debe, entre otras cosas a una falla en el transportador de electrones mitocondrial. Además, el aumento de la glucosa intracelular produce la activación de diversas vías moleculares contribuyendo a la generación de ROS. En aerobiosis, más del 90% del oxígeno consumido es transformado en agua por la citocromo oxidasa en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, el 10% restante forma radicales superóxido que serán eliminados por mecanismos antioxidantes. En diabetes, aumenta la glucosa, por lo tanto, aumenta el flujo en la cadena transportadora de electrones lo que aumenta la tasa ATP/ADP, esto inhibirá la cadena transportadora de electrones produciendo una acumulación de ROS por la reducción parcial de oxígeno. (20)

## **2.9. Otras vías productoras de ROS**

Dentro de las vías más importantes podemos destacar, está la autooxidación de gliceraldehido-3-fosfato, debido a la acumulación de glucosa se inhibe la acción de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, por lo que el gliceraldehido-3-fosfato se acumulará e inducirá la formación de ROS. Otra vía de generación de ROS es la activación de la Proteína quinasa C (PKC), en hiperglicemia la PKC será activada por un aumento de diacilglicerol (DAG), esto producirá la fosforilación de una serie de proteínas como NADPH oxidasa y un intercambiador de sodio e hidrógeno (NHE), desencadenando el aumento de ROS. (20)

## **2.10. Glucolipototoxicidad en células beta**

El termino glucolipototoxicidad se refiere a los efectos deletéreos que sufre la célula beta pancreática cuando se presentan altos niveles de glucosa y ácidos grasos libres en su ambiente. En la actualidad se sabe que un factor de riesgo para padecer diabetes mellitus tipo 2 es la obesidad, en donde los niveles de ácidos grasos libres en la sangre aumentan provocando la disfunción anteriormente mencionada, junto con disminución de la secreción de insulina y muerte de la célula beta por apoptosis. (21)

Los ácidos grasos pueden activar directamente vías de señalización proinflamatorias que potencia la toxicidad, estudios han demostrado que tratar células beta con palmitato incrementa la producción de citoquinas y el reclutamiento de macrófagos proinflamatorios, mediante la vía TLR4-MyD88. Además, los lípidos potencian el estrés en el retículo endoplasmático mediante la activación de IRE1/Xbp. Pero este estudio se enfoca en el estrés oxidativo producido por ácidos grasos en la célula beta pancreática, ya que, como se mencionó anteriormente, la célula beta tiene limitadas defensas antioxidantes y son particularmente susceptibles a daño oxidativo. Ácidos grasos saturados como palmitato inducen estrés en el retículo endoplasmático y estrés oxidativo, mientras que los ácidos grasos insaturados ejercen un efecto protector. (22)

Para explicar el daño oxidativo por palmitato, estudios demuestran que el palmitato ingresa a la célula beta pancreática donde es utilizado para sintetizar ceramida, este lípido induce daño mitocondrial e incrementa la generación de especies reactivas del oxígeno, lo que posteriormente activa vías pro-apoptóticas y genera muerte celular. Además, las especies reactivas de oxígeno inducen fosforilación de CAV1 en la tirosina-14 que favorece la apoptosis. (23)



## **2.11. Disfunción de célula beta y Sistema Ubiquitin-Proteasoma**

Ubiquitin-proteasoma es un sistema de proteólisis intracelular dependiente de ATP altamente regulado, su función es degradar proteínas innecesarias o dañadas, permitiendo así el mantenimiento del ciclo celular, la muerte celular y los procesos de transducción. Las células beta pancreáticas requieren un sistema de control de proteínas mal sintetizadas altamente eficiente, debido a que su función es sintetizar proteínas para mantener la homeostasis. Estudios han demostrado que en pacientes diabéticos hay una elevada actividad del proteasoma, el cual disminuye en los pacientes tratados con insulina, ya que este tratamiento reduce los niveles de estrés que se genera en la célula beta al tener que estar constantemente secretando esta hormona. La disfunción de la actividad del proteasoma se asocia por una acumulación de amilina (polipéptido amiloide de los islotes), el cual disminuye la expresión de ubiquitin hidrolasa. Pero, por otra parte, se ha encontrado que la lipotoxicidad mediada por palmitato disminuye la actividad del proteasoma, induciendo estrés de retículo endoplásmico y disminuyendo la expresión de proteínas que bloquean la apoptosis como Bcl-2. (24)

## **2.12. Palmitato**

El palmitato es la sal del ácido palmítico, el cual es un ácido graso saturado de cadena larga, ya que contiene dieciséis átomos de carbono. En el cuerpo humano se sintetiza cuando hay un exceso de carbohidratos. Cabe destacar que este es el primer ácido graso que se genera durante la síntesis de estos lípidos, actuando como precursor de ácidos grasos más largos. (25)

Los ácidos grasos libres son importantes recursos que requieren las células de nuestro organismo para producir energía de manera eficiente. Estos entran a la mitocondria gracias a una proteína llamada CPT1 y sufren de beta-oxidación para generar acetil-CoA, molécula que sirve como sustrato del ciclo de Krebs. (26)

Un exceso de ácidos grasos libres induce la producción de especies reactivas de oxígeno, y como se mencionó anteriormente, genera lipotoxicidad, desregulación de calcio, disfunción mitocondrial y muerte celular. El palmitato es el ácido graso libre más abundante, representando un 70 – 80% del total de ácidos grasos libres en el plasma. Estudios han demostrado que en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, los niveles de ácidos grasos libres en el plasma están significativamente más altos en comparación con sujetos sanos. (27)

### **2.13.      Ácido oleico**

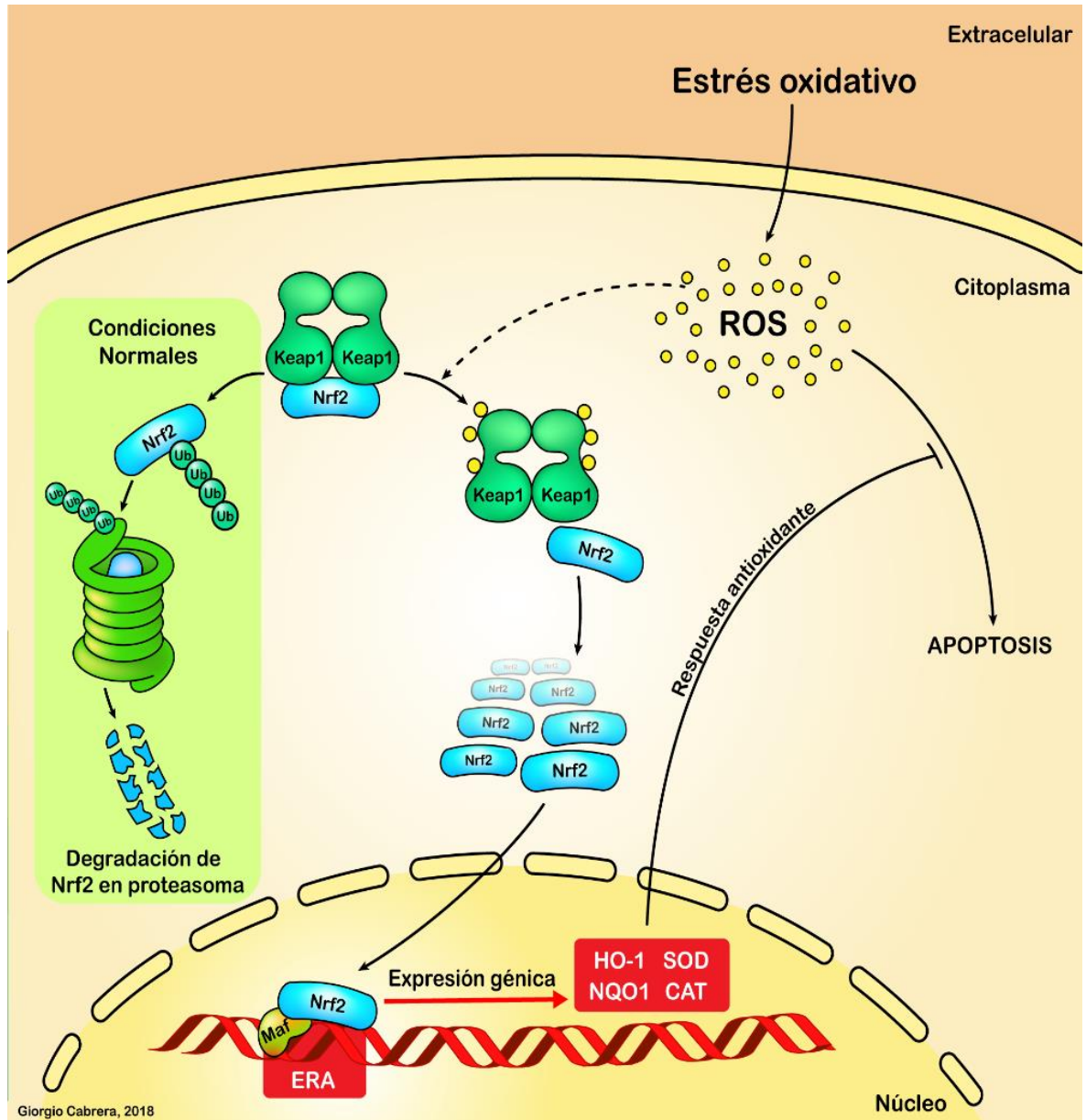
El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado que contiene dieciocho átomos de carbono, es el ácido graso más frecuente encontrado en la naturaleza, ya que está presente en vegetales como la palta y diversos frutos secos, a diferencia del ácido palmítico, el cual es considerado dañino para el organismo, el ácido oleico presenta efectos benéficos. (28)

### **2.14.      Efectos del ácido oleico en las células beta**

Estudios han indicado que incubar células beta pancreáticas con ácido oleico no genera ceramida la cual, por la activación de diversos mecanismos, va a producir apoptosis, además, la incubación de ácido oleico en conjunto con ácido palmítico disminuye los efectos negativos que tiene el ácido graso saturado. Esto se debe a la activación de AMPK mediada por AMP, la AMPK es un sensor que regula la inflamación y se considera un objetivo terapéutico para la diabetes. Otro rol benéfico del ácido oleico es la generación de oleiletanolamida (OEA) el cual es un agonista de PPAR- $\alpha$ , responsable del metabolismo de lípidos, por lo tanto, al aumentar la concentración de OEA, se genera una reducción del peso corporal al aumentar la lipólisis y posterior oxidación de ácidos grasos en el musculo esquelético. (28)

## **2.15. Vía de señalización Nrf2**

El factor de transcripción Nrf2 (Nuclear related factor 2) es un potente activador transcripcional y juega un papel central en la expresión de múltiples genes que sintetizan proteínas generadoras de protección antioxidante. Como se puede observar en la Figura 1, esta proteína se encuentra normalmente en el citoplasma, asociada a Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), la cual favorece la ubiquitinización del factor de transcripción. Bajo condiciones fisiológicas normales, Nrf2 es constantemente degradado por la vía ubiquitin-proteasoma la cual es dependiente de Keap1. Pero en presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), Nrf2 se libera de Keap1, parando así su degradación en el proteasoma y posteriormente translocándose al núcleo, donde interaccionará con una proteína pequeña denominada Maf, el complejo Nrf2-Maf se unirá a la región del ADN donde se encuentran los genes de los elementos de respuesta antioxidante (ERA) e inducirá su expresión. (29)



**Figura 1. Vía de señalización de Nrf2-Keap1.** En la figura se puede evidenciar lo que ocurre con Nrf2 en condiciones fisiológicas normales, donde es degradado en el proteasoma y lo que ocurre bajo condiciones de estrés oxidativo, donde se separa de Keap1 y se transloca al núcleo, uniéndose a Maf y generando expresión génica de elementos de respuesta antioxidante (HO-1, SOD, NQO1 y CAT).

## **2.16. Elementos de respuesta antioxidante**

Luego de la translocación de Nrf2 al núcleo, este induce la expresión de los elementos de respuesta antioxidante (ERA), los cuales son enzimas como NADPH:quinina óxidoreductasa 1 (NQO1), hemo oxigenasa-1 (OH-1),  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y GST, las cuales son enzimas que se encargan de detoxificar las células de los agentes reactivos y su expresión es regulada por el factor de transcripción Nrf2. (5)

### **2.16.1. Hemo oxigenasa-1**

Hemo oxigenasa-1 (OH-1) es una enzima presente en animales y plantas, en mamíferos está anclada al retículo endoplasmático catalizando un paso limitante en la degradación del grupo hemo. La oxidación del grupo hemo por la OH-1 involucra una serie de reacciones redox y la participación de la citocromo p450 reductasa que genera posteriormente CO,  $\text{Fe}^{2+}$  y biliverdina, la cual luego es convertida en bilirrubina por la biliverdina reductasa. El mecanismo antioxidante de la enzima viene dado por los productos que forma, estudios indican que la biliverdina y bilirrubina captan radicales peroxilos y disminuyen la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad. (30)

Se han identificado tres isoformas de hemo oxigenasa, aunque catalizan la misma reacción bioquímica, estas isoformas son productos de diferentes genes con diferentes patrones de expresión en células y tejidos. OH-3 (33 kDa) es una proteína con una baja catálisis que se puede encontrar sólo en cerebro de rata, y no se ha reportado actividad en humanos. OH-2 (36 kDa) contribuye a la homeostasis celular y está expresada en muchos tejidos incluyendo el cerebro y los testículos, mientras que OH-1 (32 kDa), también conocida como Hsp32, es inducida por estrés y está expresada en bajas concentraciones en los tejidos. OH-1 se expresa por metales pesados, shock térmico, isquemia, shock hemorrágico, especies reactivas del oxígeno, radiación e hipoxia, además estudios *in vitro*

han demostrado que citoquinas inflamatorias como IL-1, TNF-alfa, LPS, y especies reactivas de nitrógeno también pueden estimular la expresión de OH-1. (31)

Estudios indican que los productos de esta enzima pueden desencadenar una serie de efectos benéficos para ciertas enfermedades, por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de hemo oxigenasa 1 en tejido gastrointestinal juega un rol crítico en la citoprotección y anti-inflamación. (32)

Con relación al páncreas, se ha estudiado el efecto benéfico que tiene la expresión de OH-1 en pancreatitis aguda. Esta proteína está sobre expresada en pacientes hospitalizados que presentan pancreatitis aguda y modelos animales. (33)

#### **2.16.2. NADPH quinina oxidoreductasa 1 (NQO1)**

NQO1 es una de las dos quinonas reductasas más importantes en mamíferos, es altamente inducible y juega un rol en la adaptación celular al estrés. Su función principal es reducir quinonas a hidroquinonas, el cual es un mecanismo conocido de detoxificación. Las quinonas son especies electrofílicas capaces de reaccionar con nucleófilos celulares y además por medio de semiquinonas pueden interaccionar con oxígeno molecular generando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que son capaces de producir daño celular, es por ello que su conversión a hidroquinona es un paso fundamental para disminuir el estrés oxidativo en las células. (34)

En este estudio se utilizaron tres genes pertenecientes a los elementos de respuesta antioxidante, entre los cuales tenemos el gen de Hemooxigenasa-1 (OH-1), Peroxiredoxin-1 (Prdx-1) y Superoxido dismutasa-1 (SOD-1), que fueron utilizados en estudios anteriores. (35)

## **2.17. Activadores de Nrf2**

### **2.17.1. Ter-butil-hidroquinona**

Ter-butil-hidroquinona (t-BHQ) es un compuesto usado comúnmente como antioxidante sintético para las comidas, el cual previene deterioro oxidativo y rancidez de aceites y grasas debido a su potente actividad anti-peroxidación lipídica. Se propone que su mecanismo de acción es la disociación del complejo Nrf2-Keap1, estabilización de Nrf2, y activación de la vía MAPK. Un estudio ha demostrado que alimentar ratas, previa administración de estreptozotocina, con t-BHQ, aumenta su secreción de insulina estimulada por glucosa, y fueron resistentes al desarrollo de diabetes en comparación con ratas tratadas solamente con estreptozotocina, pero no se midió la activación del factor de transcripción Nrf2. (6, 36)

Además, se ha comprobado que t-BHQ protege células neuronales de neurotoxicidad producida por plomo mediante la vía de señalización Nrf2/OH-1. (37) Dentro de las diversas células estudiadas están: células de timo, células hepáticas, células renales, entre otras.



### **2.17.2. Ter-butil-hidroquinona (t-BHQ) y diabetes**

Los efectos antioxidantes de la t-BHQ son ampliamente conocidos, ya que se han realizado diversos experimentos probando este compuesto en modelos celulares y animales. Un estudio buscó evaluar la expresión de OH-1, un elemento de respuesta antioxidante activado por NRF2, y VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular, de la retina de ratas diabéticas, y los resultados mostraron que la t-BHQ promueve la secreción de insulina, disminuye los niveles de glucosa, induce la expresión de OH-1 y disminuye la expresión de VEGF para proteger la retina de las ratas. (38)

Otro estudio habla sobre como t-BHQ atenúa el daño a los glomérulos en ratones diabéticos mediante la activación de NRF2. En este estudio se utilizaron ratones CD-1a los cuales se les indujo diabetes mediante estreptozotocina y además fueron tratados con t-BHQ al 1% en su dieta por tres meses. Luego a estos se les realizó diversas mediciones biológicas, y se encontró que en ratones tratados con t-BHQ se redujo significativamente el malondialdehído glomerular y plasmático, también disminuyó la proteinuria, acumulación de fibronectina, aumento la expresión de OH-1 y gamma-GCS y estimuló la acumulación de NRF2 en el núcleo de las células. (39)

### **2.17.3. Flavonoides**

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales con múltiples estructuras fenólicas, es decir, compuestos químicos que tienen un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Se pueden encontrar en frutas, vegetales, granos, semillas, raíces, flores, vinos, etc. Múltiples estudios han mostrado efectos beneficiosos de estos compuestos en la salud de individuos. Actualmente los flavonoides se utilizan en una variedad de aplicaciones farmacéuticas, medicinales, nutricionales y cosméticas, debido a que tienen propiedades anti-oxidativas, anti-inflamatorias, anti-mutagénicas y anti-cancerígenas. La información sobre los mecanismos de acción de las propiedades benéficas de los flavonoides no se conoce suficientemente, sin embargo, es sabido desde la antigüedad que los derivados de las plantas poseen un amplio espectro de actividades biológicas. (40)

En las plantas, los flavonoides son sintetizados en sitios particulares y son responsables del color y aroma de las flores y frutas para así atraer insectos para la polinización y su subsecuente dispersión. Además, protegen a las plantas de diversos agentes estresores, funcionan como moléculas señalizadoras, agentes desintoxicantes y antimicrobianos. (41)

### **2.17.4. Clasificación de los flavonoides**

Los flavonoides pueden dividirse en diferentes subgrupos dependiendo de la unión entre los anillos de carbono que posee su estructura. Así pueden diferenciarse entre isoflavones, neoflavonoides, antocianinas, entre otros. (40)

### **2.17.5. Quercetina**

La quercetina es un flavonoide, uno de los grupos polifenólicos más abundantes en plantas (frutas y vegetales), estudios en células hepáticas han demostrado que puede activar Nrf2 mediante la vía p38-MAPK, otros estudios han demostrado que la quercetina puede combatir el estrés por LPS en células microgliales mediante la producción de OH-1, enzima inducida por Nrf2. En relación con las células beta, se ha demostrado que la quercetina previene y protege del estrés oxidativo inducido por estreptozotocina a células beta pancreáticas de rata, pero no se estudió, la activación de Nrf2. (42-44)

### **2.17.6. Quercetina como suplemento alimenticio**

En la naturaleza (vegetales como manzanas, maqui, cebollas entre otras), la quercetina se encuentra conjugada con un azúcar, pero luego se disocia en el intestino, por otra parte, existen suplementos alimenticios de quercetina en donde está libre de la glucosa. Se han realizado estudios en donde se estima que el consumo diario de quercetina en una persona que tiene una dieta occidental es de 3 a 40 mg. (45)

Luego del consumo de quercetina y de ser separada del residuo de glucosa en el intestino, esta atraviesa pasivamente el epitelio intestinal, o mediante co-transporte sodio-glucosa cuando no es separada del residuo glicosídico. La quercetina es metabolizada en los enterocitos y en el hígado formando una serie de metabolitos, ya que puede sufrir metilación, sulfatación o glucoronización. A pesar de los diversos efectos benéficos que se ha encontrado en la quercetina, si esta se administra en dosis altas puede ser tóxica para el organismo, ya que estudios indican que una dieta alta en quercetina puede causar aumento de los efectos nefrotóxicos en un riñón previamente dañado, aunque todavía faltan estudios que confirmen esto. Además, se han encontrado efectos protectores de quercetina en tumores debido a los efectos antioxidantes. (46)

La quercetina se considera un posible activador de Nrf2, y debido a la falta de publicaciones que asocien células beta pancreáticas y quercetina, este estudio se considera relevante, ya que se podría encontrar un posible tratamiento para aumentar la capacidad antioxidante de células beta pancreáticas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y así disminuir las complicaciones de esta enfermedad a medida que la persona envejece, aumentando así su expectativa de vida.

#### **2.17.7. Potencial antidiabético de Quercetina**

Se ha reportado que la quercetina puede interactuar con diversas moléculas que se encuentran en el intestino delgado, páncreas, músculo esquelético, tejido adiposo e hígado para controlar la homeostasis de la glucosa. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la absorción intestinal de glucosa, y los mecanismos de secreción de insulina para mejorar la utilización de glucosa en los tejidos periféricos. Estudios recientes han detectado quercetina en plasma sanguíneo después de consumir suplementos o alimentos que contienen la molécula antioxidante y que tendría una vida media prolongada en el cuerpo humano. (47)

### **2.17.8. Quercetina en ensayo MTT**

El MTT es un reactivo utilizado para determinar la viabilidad en ensayos de proliferación y citotoxicidad celular. El mecanismo de acción consiste en que las células vivas pueden reducir el MTT en un compuesto púrpura insoluble denominado formazán mediante la enzima succinato deshidrogenasa presente en su mitocondria, luego este formazán es solubilizado con un disolvente y se posteriormente se lee la absorbancia a 570 nm, a mayor absorbancia, mayor cantidad de células vivas. Diversos estudios han demostrado que la quercetina puede reducir el reactivo MTT en ausencia de células vivas. Por lo tanto, al incubar quercetina en medio de cultivo celular, sin células y realizar el ensayo de MTT puede originar formazán, interfiriendo en el ensayo. Para evitar la interferencia se pueden lavar bien las células para eliminar la quercetina o se puede realizar un blanco de reactivo que contenga quercetina y medio de cultivo sin células para luego restar la absorbancia de las diferentes concentraciones que se requiere en el estudio. (48)

### **3. HIPÓTESIS**

La activación de Nrf2 ejerce un efecto protector en células beta pancreáticas murinas frente a daño oxidativo por palmitato *in vitro*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evidenciar el efecto protector de la activación de Nrf2 en células beta pancreáticas murinas frente a daño oxidativo por palmitato *in vitro*.

#### **4.1. Objetivos específicos**

- Determinar la concentración de t-BHQ y Quercetina óptima para realizar ensayos de viabilidad celular en células beta pancreáticas MIN6.
- Evaluar la activación de NRF2 por t-BHQ y Quercetina en células beta pancreáticas MIN6.
- Evaluar el efecto citoprotector de la activación de Nrf2 en células beta pancreáticas MIN6 frente a daño oxidativo por palmitato *in vitro*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. REACTIVOS

Línea celular MIN6: donadas gentilmente por el Dr. Andrew Quest (Universidad de Chile, Laboratorio de Comunicaciones Celulares), medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium- High glucosa* (DMEM-H, por su sigla en inglés) que contiene 4,5 g/L de glucosa y L-glutamina (*Biological industries*, U.S.A.), suero fetal bovino inactivado al 10% estéril (*HyClone* de *Thermo Scientific*), penicilina/estreptomicina al 5% (*Gibco*), PBS al 10x estéril (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM tampón fosfato pH 7.4) (*Calbiochem*), tripsina-EDTA 1x (*Gibco*), DMSO (*Duchefa Biochemie*, Netherlands), agua destilada, MTT Cell Proliferation Assay Kit (*Cayman Chemical*, U.S.A.), ácido palmítico (*Merck*, U.S.A.), ter-butil-hidroquinona (*Merck*, U.S.A.), quercetina, RNA-Solv Reagent (*Omega Bio-tek*, U.S.A.), cloroformo (*Merck*, U.S.A.), isopropanol (*Merck*, U.S.A.), etanol (*Merck*, U.S.A.), agua DEPC (*Santa Cruz Biotechnology*, U.S.A.), 5X All-in-One RT MasterMix (*ABM*, Canada), Takyon<sup>tm</sup> Rox SYBR<sup>®</sup> MasterMix dTTP Blue (*Eurogentec*), primers que se puede observar en la tabla 1 (*Integrated DNA Technologies*, U.S.A.).

### 5.2. CULTIVO CELULAR

Se utilizó una línea celular beta pancreática proveniente de ratón: MIN6, la cual se originó de un insulinoma, tiene morfología epitelial y propiedades adherentes en una placa de cultivo (49). Estas células fueron cultivadas en placas de Poliestireno Falcon con medio de cultivo DMEM alto en glucosa, con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y antibióticos como penicilina y estreptomicina, a un pH de 7.5. Las placas de poliestireno se mantuvieron en estufas de cultivo a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.3. CAMBIO DE MEDIO Y LAVADO**

Para cambiar el medio DMEM y lavar las células, se retiró completamente el medio antiguo con pipeta Pasteur unida a un extractor y posteriormente se agregó PBS hasta cubrir completamente la placa con las células adheridas y luego se movió cuidadosamente para remover todas las células muertas en suspensión. Luego ese PBS con células muertas se eliminó teniendo en consideración no remover la capa de células vivas adheridas a la placa. Este proceso se repitió dos veces y al final se agregó el medio de cultivo nuevo para volver a la incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron 2 veces por semana y se tripsinizaron 1 vez a la semana.

### **5.4. TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS**

Posteriormente, para poder usar las células en los distintos experimentos, y una vez ya lavadas, se agregó a la placa, 0,5 ml de tripsina-EDTA homogenizando con un movimiento ondulante para despegar todas las células vivas de la placa. Luego se incubó cinco minutos a 37 °C, y se agregó 2 ml del medio de cultivo DMEM con suero fetal bovino para inactivar la acción de la tripsina. Por último, se realizó una observación microscópica de las células para observar si se disgregaron correctamente. Para sembrar las células en las placas de 96 pocillos se hizo una dilución de 1:4 con PBS a partir de las células disgregadas y luego fueron contadas con una cámara de Neubauer, obteniendo un promedio de los cuatro cuadrantes el cual se multiplicó por 5 y luego por 10.000 para obtener la concentración de células por mililitro. Teniendo esa concentración se realizaron los cálculos para obtener una concentración final de 60.000 células por pocillo, teniendo en cuenta de que en cada pocillo se tendrá un volumen final de 100 µL.



## 5.5. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ELEMENTOS DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Para medir la activación de Nrf2 con los compuestos se realizó una RT-qPCR cuyos genes objetivos fueron 18s rRNA como housekeeping, Nrf2, hemooxigenasa-1 (OH-1), Peroxiredoxin-1 (Prdx1) y Superoxido dismutasa-1 (Sod1), las secuencias de los primers se pueden observar en la tabla 1. Las células fueron incubadas en placas de 60 mm de diámetro con una confluencia del 90%, con 3 ml de medio de cultivo DMEM alto en glucosa por 24 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, luego de este tiempo se lavaron con PBS y se les cambió el medio por uno que contenía el tratamiento en estudio, los cuales fueron ter-butyl-hidroquinona 50 µM, quercetina 50 µM, palmitato 500 µM y ácido oleico 500 µM, además de un grupo control sin tratamiento, se dejaron incubar por otras 24 horas, al completar ese tiempo, las células se lavaron con PBS y se procedió a realizar la extracción de ARN con RNA-solv<sup>®</sup> Reagent (Omega Biotek, 2019) siguiendo las instrucciones del proveedor, luego de realizar la extracción se procedió a verificar la pureza del ARN midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm utilizando el lector multi modal Synergy HTX (Biotek, U.S.A.) y luego dividiendo estos dos resultados, para obtener un valor entre 1,8 y 2,0, y el equipo realizó el cálculo para obtener la concentración de ARN total, con este cálculo se procedió a normalizar las concentraciones de ARN dejándolos a todos a una concentración de 150 ng/µL. Luego se realizó la retrotranscripción con el kit 5X All-in-One RT MasterMix siguiendo las instrucciones del fabricante e igualmente se cuantificó el cDNA generado midiendo su absorbancia a 260 y 280, para así normalizar las concentraciones de cDNA a 500 ng/µL quedando listo para su uso.

Para realizar la qPCR se necesitó calcular la temperatura de annealing de cada gen para ello primero se calculó la temperatura de melting (T<sub>m</sub>) de cada primer mediante el software online OligoAnalyzer perteneciente a Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), luego se procedió a calcular la temperatura de melting del producto generado en cada par de primers, para ello se utilizó el software BLAST de NCBI para obtener el producto de los primers y con la secuencia de este producto se calculó su T<sub>m</sub> en OligoAnalyzer. Teniendo ya la T<sub>m</sub> de los primers y la T<sub>m</sub> del

producto se utilizó la siguiente fórmula para obtener la temperatura de annealing de cada gen (50):  $T^{\circ} \text{ annealing} = 0.3 \times (T_m \text{ del primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ del producto}) - 14.9$

Donde la  $T_m$  del primer corresponde a la menor  $T_m$  de entre los dos primers del gen y la  $T_m$  del producto es el producto de la reacción, en la tabla 1 se observan las temperaturas de annealing calculadas para cada gen. Para realizar la qPCR se utilizó el kit Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (*Eurogentec*) y el equipo AriaMx (*GeneXpress*).

**Tabla 1.** Listado de primers correspondientes a los genes de los elementos de respuesta antioxidante, housekeeping y Nrf2.

Gen	Primer sense	Primer antisense	T <sup>a</sup>
<i>18s</i>	CGAACGTCTGCCCTATCAACTT	CCGGAATCGAACCCCTGATT	60°C
<i>Nrf2</i>	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA	GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT	55°C
<i>Hmox-1</i>	CCTCACTGGCAGGAAATCATC	CCTCGTGGAGACGCTTTACATA	56°C
<i>Prdx-1</i>	TCCAAGCGCACCATTG	AGGCCCTGAAAGAGATACCTT	51°C
<i>Sod-1</i>	GTGATTGGGATTGCGCAGTA	TGGTTTGAGGGTAGCAGATGAGT	52°C

T<sup>a</sup>: temperatura de annealing calculada.

## 5.6. COMPARACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Para analizar los datos obtenidos de la qPCR, se realizó una comparación relativa de la expresión de los ARNm, para ello se utilizó el método de comparación de Ct. En una qPCR se genera un gráfico donde en el eje Y se aprecia la fluorescencia de la amplificación y en el eje X están los ciclos de la reacción, en una qPCR normal, a mayor cantidad de ciclos, mayor es la fluorescencia hasta cierto punto. Para entender que es el Ct, primero hay que saber que es la línea threshold, la cual es el nivel de fluorescencia en donde se considera que la reacción sobrepasó los niveles basales, por lo tanto, es el inicio de la fase exponencial. El valor de Ct (cycle threshold) representa el ciclo en donde la amplificación intercepta la línea threshold, por lo tanto, a menor Ct, mayor cantidad de material genético

existe. El método de comparación de Ct consiste primero en obtener un valor denominado  $\Delta Ct$  para cada tratamiento y se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen estudiado} - Ct \text{ gen housekeeping}$$

Luego se calculó el  $\Delta\Delta Ct$  que consiste en restar el  $\Delta Ct$  de cada muestra menos el  $\Delta Ct$  de la muestra control, en este experimento la muestra control son las células sin tratamiento:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra tratada} - \Delta Ct \text{ muestra control}$$

Por último, para generar el gráfico se calculó  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## **5.7. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR CON ACTIVADORES DE NRF2**

Para evaluar la viabilidad celular con los distintos activadores de NRF2 se sembraron las células en placas de 96 pocillos con una concentración de 60.000 células/pocillo. Se utilizó medio DMEM alto en glucosa por 24 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, luego de ese tiempo se agregaron las distintas concentraciones de los reactivos.

Para estudiar la viabilidad celular con quercetina se utilizaron las siguientes concentraciones: 50, 100 y 200  $\mu M$ , el estándar para realizar estas diluciones se preparó en DMSO con PBS en el mismo momento ya que la quercetina tiene muy baja solubilidad. Las células se incubaron por 24 horas y luego se realizó el ensayo de MTT siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron controles que solo contenían el vehículo de la quercetina el cual fue DMSO 0,4% y también PBS. Además, se realizaron controles con cada concentración de quercetina sin células para evitar interferencias de la propia quercetina con el MTT.

Para estudiar la viabilidad celular con t-BHQ se utilizaron las siguientes concentraciones: 25, 50 y 100  $\mu M$ , las cuales se incubaron de igual forma que la quercetina y luego se realizó el ensayo de MTT. Se realizaron los mismos controles, DMSO 0,4%, PBS, y control de t-BHQ sin células.

Para estudiar el efecto protector de los activadores de NRF2 frente a daño oxidativo por palmitato, se sembraron 60.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, se dejaron

incubar 24 horas, luego se añadieron los activadores de NRF2 a 25 y 50  $\mu$ M, se dejó incubar a 37 °C por 30 minutos y luego se agregó 10  $\mu$ l de palmitato 0,05M. Dejándolos incubar por 24 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, para posteriormente realizar el ensayo MTT siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió en el lector de multiplacas Multiskan GO (Thermo Scientific).

El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la siguiente formula:

$$\% Viabilidad = \frac{\text{Media de la absorbancia de las células tratadas}}{\text{Media de la absorbancia de las células sin tratar (Control)}} \times 100$$

## 5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

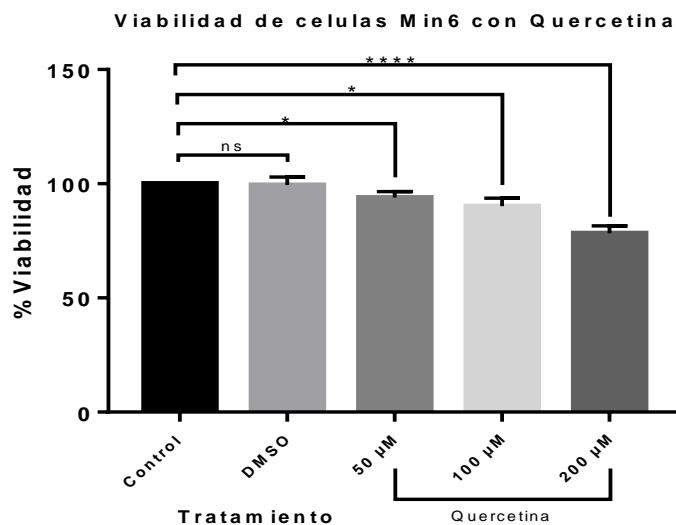
Los datos obtenidos fueron registrados y analizados utilizando el programa *GraphPad Prism 6*. Se asumió que los datos tienen una distribución normal. Por lo tanto, para los ensayos de viabilidad celular, el método a utilizado fue el t test con un análisis no pareado para comparar el porcentaje de viabilidad comparados con el grupo control. Y para analizar los valores obtenidos en la comparación relativa se utilizó la prueba ANOVA de una vía con una comparación múltiple. Se consideró estadísticamente significativos los valores de  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR CON ACTIVADORES DE NRF2

#### 6.1.1. Viabilidad de células Min6 con Quercetina

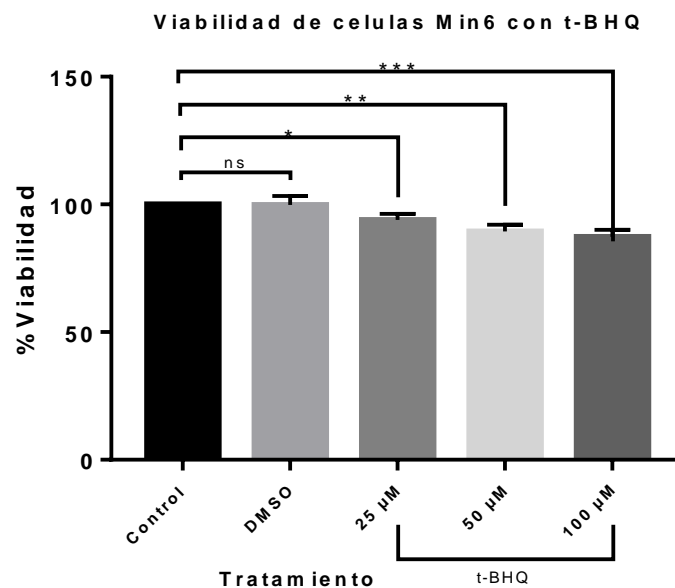
Se realizó un ensayo MTT para observar la viabilidad de las células Min6 al ser expuestas a diferentes concentraciones de quercetina (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ), se consideró como 100% de viabilidad la absorbancia del grupo control sólo con PBS, el grupo con DMSO al 0,4% presentó una viabilidad del  $99,4\% \pm 3,5$  sin diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p > 0,05$ ), los grupos tratados con quercetina a 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  presentaron una viabilidad del  $93,8\% \pm 2,7$ ;  $90,1\% \pm 3,4$  y  $78,3\% \pm 3,1$  respectivamente. Los grupos tratados con 50 y 100  $\mu\text{M}$  presentaron un valor  $p < 0,05$  (\*) y el grupo tratado con 200  $\mu\text{M}$  presentó un valor  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM (Fig 2).



**Figura 2.** Gráfico de viabilidad de células Min6 expuestas a diferentes concentraciones de quercetina (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ). Se comparó estadísticamente el grupo Control que contenía PBS con cada tratamiento utilizando el test t de student para grupos no pareados. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=6$ .

### 6.1.2. Viabilidad de células Min6 con t-BHQ

Se realizó un ensayo MTT para observar la viabilidad de las células Min6 al ser expuestas a diferentes concentraciones de t-BHQ (25, 50, 100  $\mu$ M), se consideró como 100% de viabilidad la absorbancia del grupo control solo con PBS, el grupo con DMSO al 0,4% presentó una viabilidad del  $99,7\% \pm 3,5$  sin diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p > 0,05$ ), los grupos tratados con t-BHQ a 25, 50 y 100  $\mu$ M presentaron una viabilidad del  $93,9\% \pm 2,3$ ;  $89,4\% \pm 2,5$  y  $87,3\% \pm 2,6$  respectivamente. El grupo tratado con 25  $\mu$ M presentó un valor  $p = 0,29$  (\*), el grupo tratado con 50  $\mu$ M presentó un valor  $p = 0,0021$  (\*\*) y el grupo tratado con 100  $\mu$ M presentó un valor  $p = 0,0008$  (\*\*\*). Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM (Fig 3).

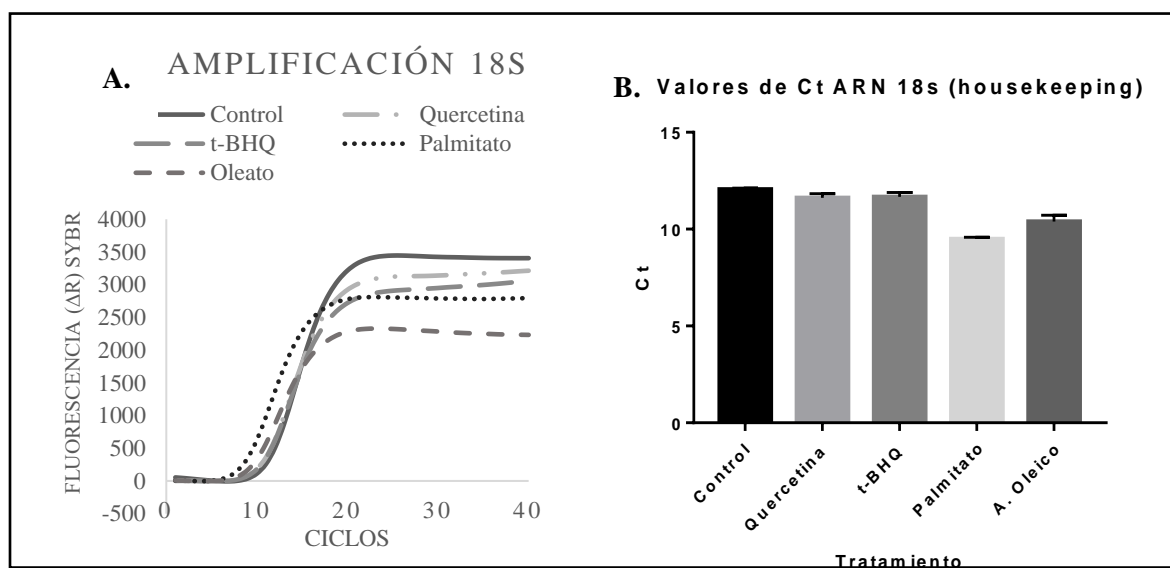


**Figura 3.** Gráfico de viabilidad de células Min6 expuestas a diferentes concentraciones de t-BHQ (25, 50, 100  $\mu$ M). Se realizó un ensayo MTT para medir la viabilidad celular, para ello se expuso a las células a los diferentes tratamientos por 24 horas. Se comparó estadísticamente el grupo Control que contenía PBS con cada tratamiento utilizando el test t de student para grupos no pareados. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM, n=6.

## 6.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ELEMENTOS DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE

### 6.2.1. Expresión de ARN: 18s rRNA

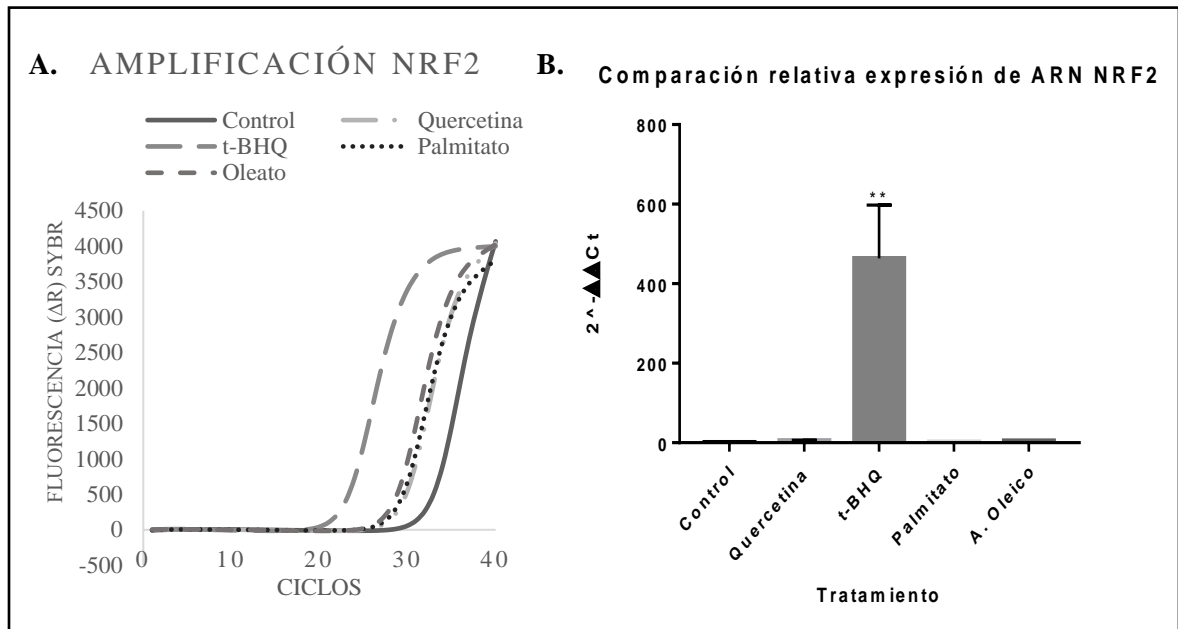
Para cuantificar la expresión del rRNA 18s se realizó una extracción de ARN a las células Min6 tratadas con los diferentes compuestos (control con PBS, quercetina 25  $\mu$ M, t-BHQ 25  $\mu$ M, palmitato 500  $\mu$ M y ácido oleico 500  $\mu$ M) por 24 horas, luego se realizó una retrotranscripción y finalmente la qPCR obteniendo los siguientes valores de Ct a partir del gráfico de fluorescencia con un threshold de 200  $\Delta$ R (Fig 4). Ct control: 12,0  $\pm$  0,03; Ct quercetina: 11,6  $\pm$  0,12; Ct t-BHQ: 11,6  $\pm$  0,12; Ct palmitato: 9,4  $\pm$  0,05 y Ct ácido oleico: 10,3  $\pm$  0,18. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM, n=3.



**Figura 4.** qPCR gen 18s rRNA (housekeeping) con los diferentes tratamientos. **A:** gráfico de fluorescencia de SYBR del gen 18s a lo largo de los ciclos de amplificación de la qPCR. **B:** valores de Ct de la amplificación del gen 18s expresados en promedio  $\pm$  SEM, n=3.

## 6.2.2. Expresión de ARN: Nrf2

Para realizar la comparación relativa se utilizó el método de comparación de Ct explicado anteriormente, se utilizó el Ct del gen housekeeping 18s rRNA y los Ct obtenidos a partir del gráfico de fluorescencia que se puede ver en la figura 5A con un threshold de 30, luego se calculó el  $\Delta Ct$ , seguido del  $\Delta\Delta Ct$  y por último el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obteniendo los siguientes resultados para cada grupo (Fig 5). Control:  $1 \pm 0$ ; Quercetina:  $5,99 \pm 0,25$ ; t-BHQ:  $463,80 \pm 134$ ; Palmitato:  $2,31 \pm 0,27$  y Ácido oleico:  $5,17 \pm 0,12$ . Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM  $n=3$ , y pueden ser interpretados como la cantidad de veces que está más o menos expresado el ARNm Nrf2 en cada grupo con respecto al control. Comparado con el control, el grupo con t-BHQ es significativamente mayor ( $p = 0,0011$ ).

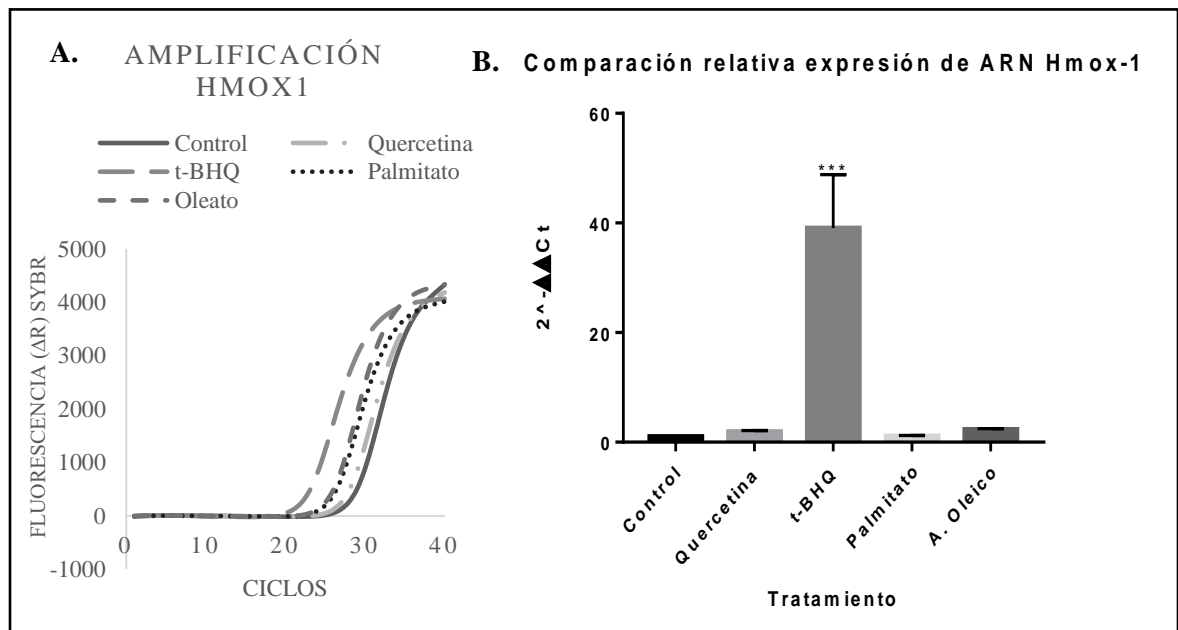


**Figura 5.** Amplificación en qPCR del gen Nrf2 con los diferentes tratamientos. **A:** gráfico de fluorescencia de SYBR del gen Nrf2 a lo largo de los ciclos de amplificación de la qPCR. **B:** comparación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de la expresión de ARN de Nrf2 expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ .



### 6.2.3. Expresión de ARN: Hmox-1

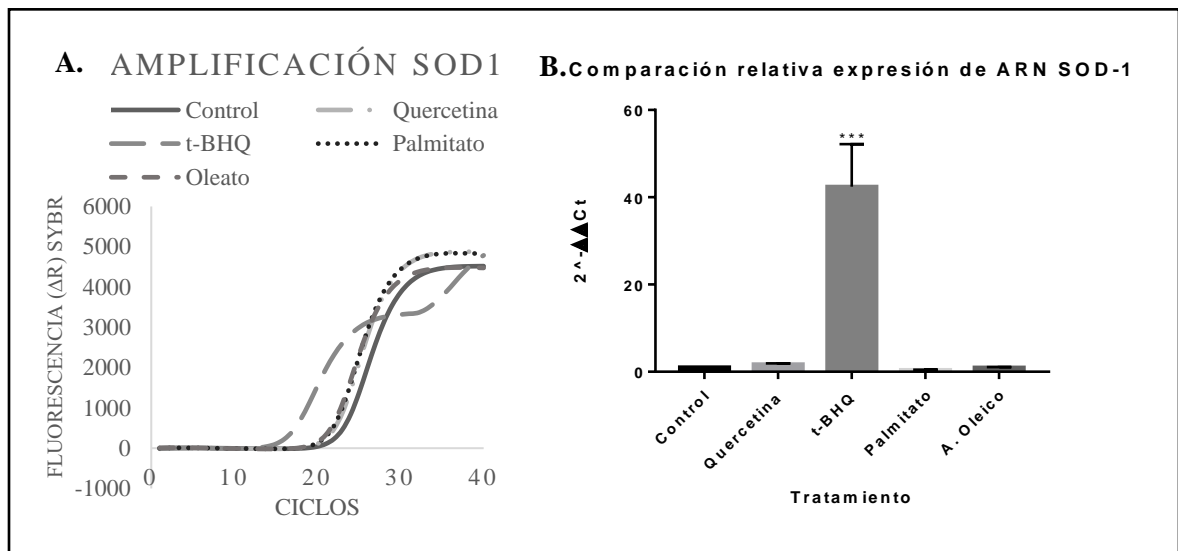
Para realizar la comparación relativa se utilizó el método de comparación de Ct explicado anteriormente, se utilizó el Ct del gen housekeeping 18s rRNA y los Ct obtenidos a partir del gráfico de fluorescencia que se puede ver en la figura 6A con un threshold de 200, luego se calculó el  $\Delta Ct$ , seguido del  $\Delta\Delta Ct$  y por último el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obteniendo los siguientes resultados para cada grupo (Fig 6). Control:  $1 \pm 0$ ; Quercetina:  $1,90 \pm 0,23$ ; t-BHQ:  $39,08 \pm 9,72$ ; Palmitato:  $1,13 \pm 0,08$  y Ácido oleico:  $2,32 \pm 0,14$ . Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM  $n=3$ , y pueden ser interpretados como la cantidad de veces que está más o menos expresado el ARNm Hmox-1 en cada grupo con respecto al control. Comparado con el control, el grupo con t-BHQ es significativamente mayor ( $p = 0,0004$ ).



**Figura 6.** Amplificación en qPCR del gen Hmox-1 con los diferentes tratamientos. **A:** gráfico de fluorescencia de SYBR del gen Hmox-1 a lo largo de los ciclos de amplificación de la qPCR. **B:** comparación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de la expresión de ARN de Hmox-1 expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ .

#### 6.2.4. Expresión de ARN: SOD-1

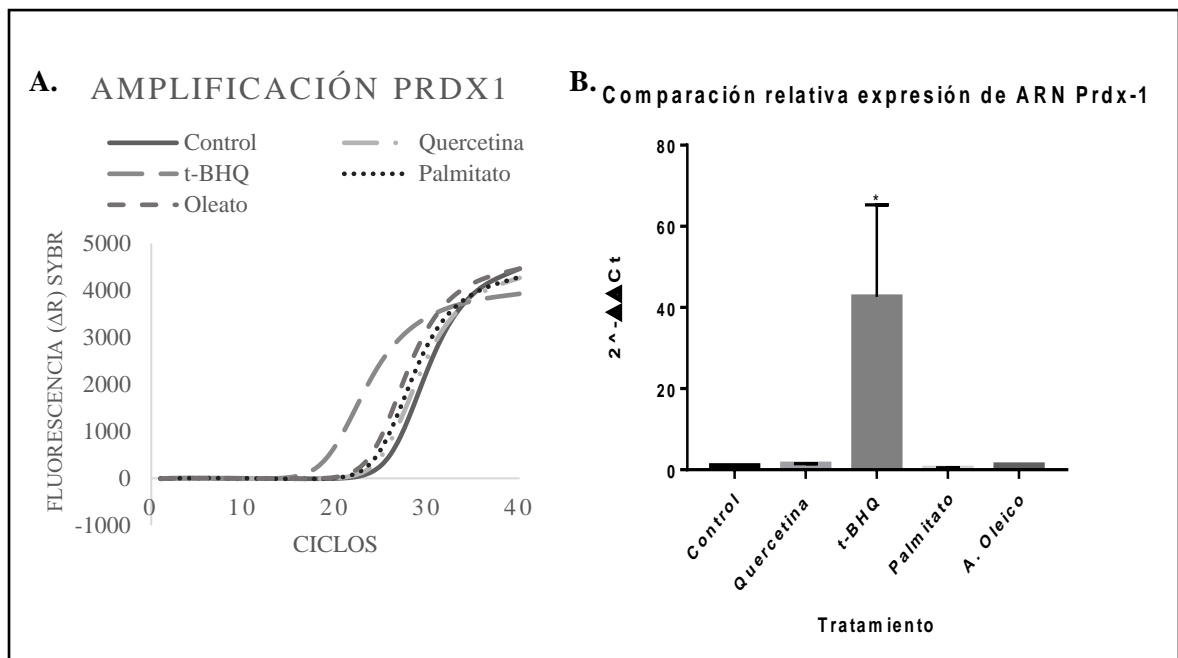
Para realizar la comparación relativa se utilizó el método de comparación de Ct explicado anteriormente, se utilizó el Ct del gen housekeeping 18s rRNA y los Ct obtenidos a partir del gráfico de fluorescencia que se puede ver en la figura 7A con un threshold de 100, luego se calculó el  $\Delta Ct$ , seguido del  $\Delta\Delta Ct$  y por último el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obteniendo los siguientes resultados para cada grupo (Fig 7). Control:  $1 \pm 0$ ; Quercetina:  $1,71 \pm 0,19$ ; t-BHQ:  $42,40 \pm 9,78$ ; Palmitato:  $0,42 \pm 0,04$  y Ácido oleico:  $0,98 \pm 0,11$ . Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM  $n=3$ , y pueden ser interpretados como la cantidad de veces que está más o menos expresado el ARNm SOD-1 en cada grupo con respecto al control. Comparado con el control, el grupo con t-BHQ es significativamente mayor ( $p = 0,0002$ ).



**Figura 7.** Amplificación en qPCR del gen SOD-1 con los diferentes tratamientos. **A:** gráfico de fluorescencia de SYBR del gen SOD-1 a lo largo de los ciclos de amplificación de la qPCR. **B:** comparación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de la expresión de ARN de SOD-1 expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ .

### 6.2.5. Expresión de ARN: Prdx-1

Para realizar la comparación relativa se utilizó el método de comparación de Ct explicado anteriormente, se utilizó el Ct del gen housekeeping 18s rRNA y los Ct obtenidos a partir del gráfico de fluorescencia que se puede ver en la figura 8A con un threshold de 80, luego se calculó el  $\Delta Ct$ , seguido del  $\Delta\Delta Ct$  y por último el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obteniendo los siguientes resultados para cada grupo (Fig 8). Control:  $1 \pm 0$ ; Quercetina:  $1,43 \pm 0,07$ ; t-BHQ:  $42,64 \pm 22,66$ ; Palmitato:  $0,44 \pm 0,01$  y Ácido oleico:  $1,25 \pm 0,01$ . Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM  $n=3$ , y pueden ser interpretados como la cantidad de veces que está más o menos expresado el ARNm Prdx-1 en cada grupo con respecto al control. Comparado con el control, el grupo con t-BHQ es significativamente mayor ( $p = 0,0489$ ).

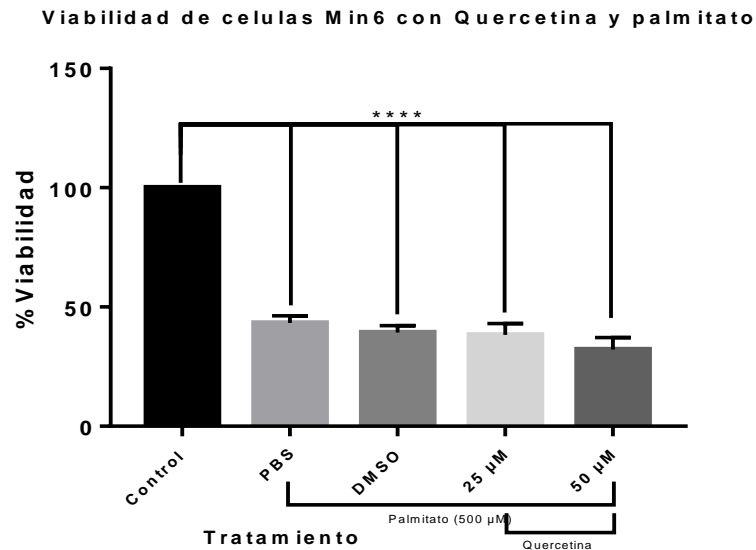


**Figura 8.** Amplificación en qPCR del gen Prdx-1 con los diferentes tratamientos. **A:** gráfico de fluorescencia de SYBR del gen Prdx-1 a lo largo de los ciclos de amplificación de la qPCR. **B:** comparación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de la expresión de ARN de Prdx-1 expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ .

### 6.3.ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE ACTIVADORES DE NRF2 FRENTE A CELULAS MIN6 EXPUESTAS A PALMITATO

#### 6.3.1. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de quercetina y palmitato

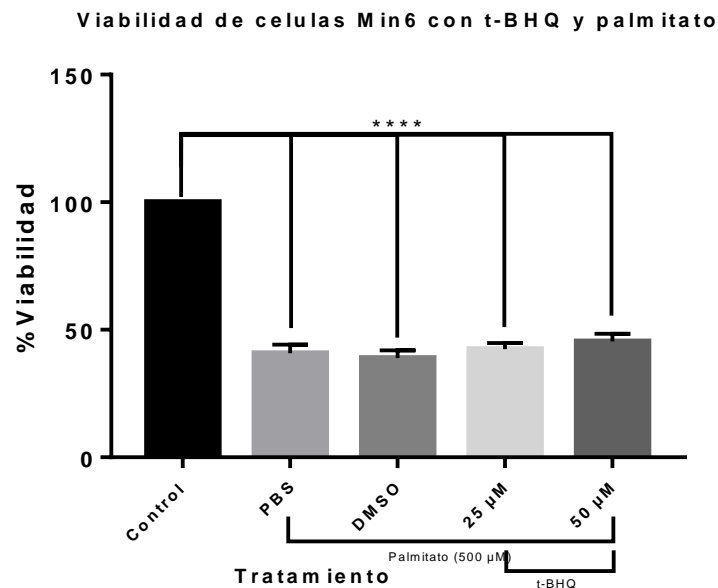
Para estudiar el efecto protector de la quercetina en células Min6 expuestas a palmitato, estas fueron incubadas previamente por 30 minutos con quercetina a 25 y 50  $\mu\text{M}$  y luego se les agregó palmitato 500  $\mu\text{M}$  y se incubaron por 24 horas, en donde posteriormente se lavaron y se procedió a realizar el ensayo de MTT. Se consideró como 100% de viabilidad la absorbancia de las células sin palmitato y sin quercetina, a partir de esto se obtuvo el porcentaje de viabilidad de los demás grupos. El grupo que sólo contenía palmitato obtuvo una viabilidad del  $43,3\% \pm 2,9$ ; el grupo con DMSO 0,4% y palmitato obtuvo una viabilidad del  $39,3\% \pm 2,8$  y los grupos con quercetina 25 y 50  $\mu\text{M}$  y palmitato obtuvieron una viabilidad del  $38,3\% \pm 4,6$  y  $32,2\% \pm 5,0$  respectivamente. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM n=6. En comparación con el grupo control sin palmitato, todos obtuvieron diferencias significativas con valor  $p < 0,0001$ .



**Figura 9.** Viabilidad de células Min6 expuestas a diferentes concentraciones de Quercetina (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y tratadas con palmitato 500  $\mu\text{M}$ . Se comparó estadísticamente cada grupo utilizando test t de student para datos no pareados. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM, n=6.

### 6.3.2. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de t-BHQ y palmitato

Para estudiar el efecto protector de la t-BHQ en células Min6 expuestas a palmitato, estas fueron incubadas previamente por 30 minutos con t-BHQ a 25 y 50  $\mu\text{M}$  y luego se les agregó palmitato 500  $\mu\text{M}$  y se incubaron por 24 horas, en donde posteriormente se lavaron y se procedió a realizar el ensayo de MTT. Se consideró como 100% de viabilidad la absorbancia de las células sin palmitato y sin t-BHQ, a partir de esto se obtuvo el porcentaje de viabilidad de los demás grupos. El grupo que sólo contenía palmitato obtuvo una viabilidad del  $43,3\% \pm 2,9$ ; el grupo con DMSO  $0,4\%$  y palmitato obtuvo una viabilidad del  $38,9\% \pm 2,9$  y los grupos con t-BHQ 25 y 50  $\mu\text{M}$  y palmitato obtuvieron una viabilidad del  $42,4\% \pm 2,4$  y  $45,4\% \pm 2,9$  respectivamente. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM  $n=6$ . En comparación con el grupo control sin palmitato, todos obtuvieron diferencias significativas con valor  $p < 0,0001$ .

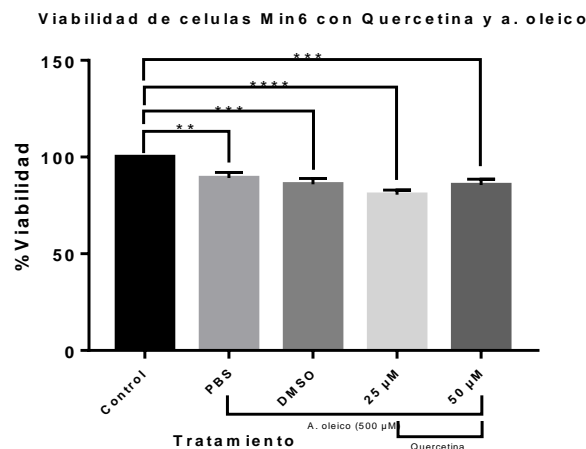


**Figura 10.** Viabilidad de células Min6 expuestas a diferentes concentraciones de t-BHQ (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y tratadas con palmitato 500  $\mu\text{M}$ . Se comparó estadísticamente cada grupo utilizando test t de student para datos no pareados. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=6$ .

## 6.4. ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE ACTIVADORES DE NRF2 FRENTE A CELULAS MIN6 EXPUESTAS A ÁCIDO OLEICO

### 6.4.1. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de quercetina y a. oleico

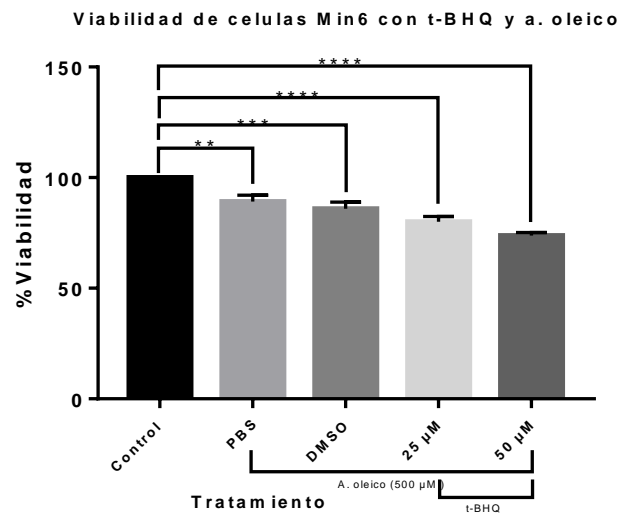
Para estudiar el efecto protector de la quercetina en células Min6 expuestas a ácido oleico, estas fueron incubadas previamente por 30 minutos con quercetina a 25 y 50  $\mu\text{M}$  y luego se les agregó ácido oleico 500  $\mu\text{M}$  y se incubaron por 24 horas, en donde posteriormente se lavaron y se procedió a realizar el ensayo de MTT. Se consideró como 100% de viabilidad la absorbancia de las células sin ácido oleico y sin quercetina, a partir de esto se obtuvo el porcentaje de viabilidad de los demás grupos. El grupo que sólo contenía ácido oleico obtuvo una viabilidad del  $89,1\% \pm 2,8$ ; el grupo con DMSO 0,4% y ácido oleico obtuvo una viabilidad del  $85,9\% \pm 3,0$  y los grupos con quercetina 25 y 50  $\mu\text{M}$  y ácido oleico obtuvieron una viabilidad del  $80,5\% \pm 2,4$  y  $85,5\% \pm 3,0$  respectivamente. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM  $n=6$ . En comparación con el grupo control sin ácido oleico, el grupo que contenía sólo ácido oleico tubo una diferencia significativa con valor  $p = 0,0035$  (\*\*), los grupos con DMSO 0,4% y quercetina 50  $\mu\text{M}$  obtuvieron una diferencia significativa con valor  $p = 0,001$  (\*\*\*) y el grupo con quercetina 25  $\mu\text{M}$  tubo un valor  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).



**Figura 11.** Gráfico de viabilidad de células Min6 expuestas a diferentes concentraciones de Quercetina (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y tratadas con ácido oleico 500  $\mu\text{M}$ . Se comparó estadísticamente cada grupo utilizando test t de student para datos no pareados. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM,  $n=6$ .

### 6.4.2. Viabilidad de células Min6 con tratamiento de t-BHQ y a. oleico.

Para estudiar el efecto protector de la t-BHQ en células Min6 expuestas a ácido oleico, estas fueron incubadas previamente por 30 minutos con t-BHQ a 25 y 50  $\mu\text{M}$  y luego se les agregó ácido oleico 500  $\mu\text{M}$  y se incubaron por 24 horas, en donde posteriormente se lavaron y se procedió a realizar el ensayo de MTT. Se consideró como 100% de viabilidad la absorbancia de las células sin ácido oleico y sin t-BHQ, a partir de esto se obtuvo el porcentaje de viabilidad de los demás grupos. El grupo que sólo contenía ácido oleico obtuvo una viabilidad del  $89,1\% \pm 2,8$ ; el grupo con DMSO 0,4% y ácido oleico obtuvo una viabilidad del  $85,9\% \pm 3,0$  y los grupos con t-BHQ 25 y 50  $\mu\text{M}$  y ácido oleico obtuvieron una viabilidad del  $80,1\% \pm 2,3$  y  $73,7\% \pm 1,3$  respectivamente. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM n=6. En comparación con el grupo control sin ácido oleico, el grupo que contenía sólo ácido oleico tubo una diferencia significativa con valor  $p = 0,0035$  (\*\*), los grupos con quercetina 25 y 50  $\mu\text{M}$  obtuvieron una diferencia significativa con valor  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) y el grupo con DMSO 0,4% tubo un valor  $p = 0,001$  (\*\*\*)).



**Figura 12.** Gráfico de viabilidad de células Min6 expuestas a diferentes concentraciones de t-BHQ (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y tratadas con ácido oleico 500  $\mu\text{M}$ . Se comparó estadísticamente cada grupo utilizando test t de student para datos no pareados. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  SEM, n=6.

## 7. DISCUSIÓN

El factor de transcripción Nrf2 es un importante regulador de la respuesta antioxidante en las células del organismo, su rol interviene directamente en la expresión de elementos de respuesta antioxidante, encargados de disminuir el daño oxidativo que afecta la funcionalidad celular, y cuyo rol en células beta pancreáticas es destacado, ya que estas células son afectadas directamente por el estrés oxidativo, generando diversas complicaciones como la diabetes mellitus. En la figura 2 se observa el estudio de viabilidad de células MIN6 (células beta pancreáticas murinas) tratadas con diferentes concentraciones de quercetina (50, 100, 200  $\mu$ M) y como control negativo se utilizó un grupo sin tratamiento y otro grupo tratado con el compuesto vehículo utilizado para disolver la quercetina, el cual es el DMSO al 0,4%. Se consideró al grupo sin tratamiento como si tuviera una viabilidad del 100% y luego se realizaron los cálculos para obtener la viabilidad de los demás grupos. El grupo con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,4% presentó una viabilidad del 99,44% y no tuvo una diferencia significativa en comparación con el grupo sin tratamiento. El DMSO es un compuesto incoloro cuya fórmula química es  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ , es utilizado generalmente como disolvente orgánico, crioperservante y medicamento, y como puede atravesar rápidamente las membranas celulares se utiliza como acarreador de fármacos. Aunque no significativo, se muestra una disminución de un 0,56% de viabilidad en las células, lo cual se correlaciona con un estudio realizado por Zhang C y col. (51) en 2017 donde describió el efecto que tiene el DMSO en cultivos celulares de neuronas y astrocitos, en dicho estudio encontró que la viabilidad y morfología de las neuronas disminuía significativamente con una concentración de DMSO mayor a 0,5%. Por otra parte, Galvao J y col. (52) en 2014, demostró que DMSO induce apoptosis en células de retina a bajas concentraciones (1, 2, 4 y 8%), además menciona que la toxicidad de DMSO a concentraciones mayores a 10% es causada por formación de poros de membrana, y concentraciones de DMSO entre 2 – 4% induce muerte celular mediante la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF por sus siglas en inglés) desde la mitocondria hacia el núcleo y de la activación de la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP por sus siglas en inglés).



La quercetina se caracterizó por presentar muy baja solubilidad en buffer fosfato salino (PBS) y solamente pudo ser disuelta en DMSO por lo cual se decidió utilizar este vehículo para el compuesto. En 2017 Xia Lv y col. (53) postuló un método para mejorar la solubilidad, estabilidad de pH y fotosensibilidad de quercetina mediante la preparación de un microemulsionado basado en aceite que mostró ser benéfico para aplicación tópica.

En la figura 2 también se puede apreciar cómo la quercetina a concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$  genera una disminución significativa de la viabilidad celular, cuyo porcentaje va desde 93,89% en el grupo tratado con 50  $\mu\text{M}$  del compuesto hasta 78,33% en el grupo tratado con 200  $\mu\text{M}$ . Si bien son numerosos los estudios que indican las propiedades benéficas que tienen los flavonoides, como sus efectos anti-inflamatorios, anticancerígenos y antioxidantes, razón por la cual se utilizó en este estudio, también existen estudios que indican efectos potencialmente tóxicos del compuesto, como por ejemplo, toxicidad mitocondrial, defectos metabólicos, mutagenicidad, etc. De acuerdo con Ruiqing Chen y col. (54), que se encontraba estudiando efectos radio-protectores de diversos flavonoides como curcumina, resveratrol y quercetina en ratones expuestos a radiación, y los autores afirman encontrar inesperadamente que los ratones expuestos a radiación y quercetina mostraron efectos negativos en su salud y pérdida de peso en comparación con ratones expuestos solo con radiación. La explicación que se propuso para esto es que la quercetina posee propiedades antioxidantes, pero también propiedades prooxidantes, este compuesto se acumula en grandes cantidades en la mitocondria, por lo tanto, se postula toxicidad asociada a cambios en la mitocondria. Este mismo autor posteriormente realizó un estudio para corroborar esta teoría y encontró que la quercetina afecta el ADN mitocondrial selectivamente afectando la expresión los genes *POLG* y *TFAM*, estos genes codifican la misma polimerasa mitocondrial. Por último, en la figura 2 se puede concluir que la quercetina genera toxicidad en células MIN6 y esta toxicidad es directamente proporcional a la concentración del compuesto, razón por la cual se utilizó una concentración menor a 50  $\mu\text{M}$  para los estudios posteriores.

En la figura 3 se observa la viabilidad de las células MIN6 tratadas con ter-butyl-hidroquinona (t-BHQ) un conocido antioxidante alimentario y activador de la vía Nrf2. El gráfico indica que la t-BHQ genera una disminución de la viabilidad celular a medida que aumenta su concentración, pasando desde un 93,95% en su menor concentración (25  $\mu\text{M}$ ), hasta un 87,36% en la mayor concentración probada (100  $\mu\text{M}$ ), el análisis estadístico indicó

que a 25  $\mu\text{M}$  existen diferencias significativas con respecto al grupo control pero la viabilidad no decae un 10% por lo tanto se utilizó esta concentración para estudios posteriores. Existen numerosos estudios que hablan de los efectos antioxidantes de este compuesto, pero otros indican que a altas concentraciones pueden provocar efectos citotóxicos. De acuerdo con Braeuning y col. (55), estos efectos citotóxicos están altamente relacionados con la formación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de procesos de reducciones cíclicas. Acorde con esto, Gharavi y col. (6) en 2007, describió los mecanismos por los cuales t-BHQ a altas concentraciones puede generar especies reactivas de oxígeno, cuando la t-BHQ reduce alguna molécula, se oxida, transformándose en una quinona llamada ter-butil-benzoquinona (T-BQ), esta conversión puede ser enzimática o no enzimática pero su producción viene acompañada de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) las cuales pueden generar daños en los distintos organelos de la célula y posteriormente apoptosis, a su vez, esta misma generación de ROS puede estar relacionada con la disociación del complejo Nrf2-Keap1 para así translocar el Nrf2 al núcleo.

Para evaluar la activación de Nrf2 por parte de la quercetina y del t-BHQ se estudió la expresión de elementos de respuesta antioxidante en células MIN6 tratadas con estos compuestos, mediante RT-qPCR. En la figura 4 se observa la amplificación del gen 18s rRNA en los cinco grupos en estudio. El gen 18s rRNA forma parte del ARN ribosomal de las células eucariontes, su expresión es constitutiva por lo tanto se utiliza como un normalizador en estudios de biología molecular, A. Bas y col. (56) en 2004 realizó un estudio para comparar distintos genes housekeeping para RT-pPCR, entre ellos estaba el 18s rRNA, mRNA de beta-actina y mRNA de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y concluyó que el 18s rRNA fue el gen housekeeping más estable y superior para análisis comparativos de expresión de mRNA en linfocitos T humanos. La expresión del gen 18S rRNA fue similar en el grupo control, grupo con quercetina y grupo con t-BHQ ya que sus valores de Ct están en el mismo nivel, pero los grupos con palmitato y ácido oleico presentan un valor menor de Ct lo que indica una mayor cantidad de material genético en las muestras, esto puede deberse a mala técnica de dilución, pero conociendo estos niveles de Ct se pueden normalizar la expresión de los otros genes.

La comparación relativa de expresión de los distintos elementos de respuesta antioxidante demostró que sólo la t-BHQ pudo aumentar la expresión de estos de manera

significativa en comparación con el grupo control, no así la quercetina la cual aumentó la expresión de los elementos de respuesta antioxidante pero no al mismo nivel que la t-BHQ. El aumento de expresión de elementos de respuesta antioxidante con t-BHQ se relaciona con un estudio publicado por Wenzhe Xu y col. (57) en donde demuestra un incremento en la expresión de las enzimas hemooxigenasa-1, Nqo1 y Gpx1 en células PC12 tratadas con t-BHQ. Sin embargo el leve aumento de expresión de elementos de respuesta antioxidante en este estudio no se relaciona con lo encontrado en la literatura, Lee Y.J. y col. (58) describieron como la quercetina restauró los niveles de expresión de hemooxigenasa-1 en hepatocitos que fueron sometidos a estrés oxidativo inducido por etanol. Por otra parte, Bahar E y col. (59), informaron que el pretratamiento de células de neuroblastoma con quercetina aumenta la expresión de hemooxigenasa-1 y proteínas de Nrf2.

En la figura 9 se evaluó el efecto protector de la quercetina en células MIN6 frente a daño oxidativo inducido por palmitato, como se mencionó anteriormente en este documento, el palmitato produce daño oxidativo que va a generar posteriormente apoptosis, en el gráfico se puede observar que el grupo control con palmitato presenta una diferencia significativa con respecto al control sin palmitato, disminuyendo la viabilidad a un 43,3%, y los distintos tratamientos con quercetina a 25 y 50  $\mu$ M junto con palmitato disminuyeron aún más la viabilidad en comparación con el grupo control, a un 38,34% y 32,20% respectivamente, lo que aparentemente indica que la quercetina no ejerce un efecto protector en células MIN6 cuando se les induce un daño oxidativo por palmitato. Esto se relaciona con el estudio de activación de Nrf2, ya que la quercetina no aumentó de manera considerable la expresión de elementos de respuesta antioxidantes en comparación con la t-BHQ, lo que significa que no activó o activó muy levemente a Nrf2. Además, también puede ser explicado ya que, como se mencionó anteriormente, la quercetina se acumula en la mitocondria y, además de sus propiedades antioxidantes, posee propiedades prooxidantes, que van a producir disminución de la expresión de genes que participan en la generación de material genético mitocondrial, y al afectar la mitocondria disminuye la viabilidad de la célula debido a factores apoptóticos. Al realizar búsqueda en “*Pubmed*” utilizando las palabras clave “quercetin and ROS” arroja una serie de resultados indicando el rol protector que posee quercetina frente a especies reactivas de oxígeno, lo cual no se correlaciona con lo encontrado en este estudio, pero se encontró una amplia variedad de estudios que demuestran efectos citotóxicos de quercetina sobre células tumorales. Por

ejemplo, Raja SB y col. (60), describieron como la quercetina induce apoptosis en células de cáncer de colon mediante la generación de ROS dependiente de ciclooxigenasa-2 (COX-2). En otro estudio, Mutlu Altundağ E y col. (61), observaron que quercetina y curcumina inducían apoptosis en células de leucemia mieloide crónica, mediante el incremento de ROS, disminución de los niveles de GSH y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo cual se asocia al estudio realizado por Ruiqing Chen y col. (54). En contraposición con el presente estudio, Carrasco-Pozo C y col. (62), demostraron el efecto protector de quercetina en células MIN6 frente a tratamiento con colesterol mediante la inhibición de la caspasa-3 y caspasa-9 además de la liberación de citocromo c.

En la figura 10 se observa la viabilidad de células MIN6 con tratamiento de t-BHQ y palmitato, se observa un leve aumento de viabilidad del grupo tratado con t-BHQ 25  $\mu$ M y palmitato en comparación con el grupo tratado solo con palmitato, de 40,86% a 42,45%, aunque si se compara con el grupo control sin palmitato, sigue siendo un aumento que no demuestra efecto protector. El grupo de t-BHQ 50  $\mu$ M con palmitato aumentó su viabilidad a un 45,48% indicando mayor viabilidad comparado con el grupo de t-BHQ 25  $\mu$ M, pero no logra acercarse al 100%. Estos resultados sugieren que la vía del Nrf2 no parece ser efectiva por sí sola para proteger a la célula MIN6 del daño citotóxico por palmitato. Ya que esta vía solo aumenta la expresión de enzimas encargadas de disminuir radicales libres pero el daño producido por palmitato no solo se debe a estrés oxidativo. Los efectos citotóxicos del palmitato podrían deberse en mayor medida, dado nuestros resultados, a otros procesos, en particular, el estrés de retículo endoplásmico que podría ser más gravitante. El estrés de retículo endoplásmico genera una acumulación de proteínas mal plegadas, esto provoca una cascada de señalización que desemboca en apoptosis celular. De acuerdo con Yin J y col. (63), adipocitos tratados con palmitato presentaron un elevado estrés de retículo endoplásmico evidenciado por aumento en marcadores de estrés de retículo endoplásmico como *ATF4* y *CHOP* y esto posteriormente generó activación de autofagia. En otro estudio Hu M y col. (64), demostraron que el palmitato genera sobreexpresión de *CHOP* en células beta pancreáticas INS-1, lo cual indica que existen estudios que demuestran la generación de estrés de retículo endoplásmico en células beta pancreáticas inducido por palmitato, siendo otro factor citotóxico que presenta este ácido graso saturado.

En las figuras 11 y 12 se observa cómo afecta el ácido oleico en lugar de palmitato a las células MIN6, se puede observar una menor disminución de la viabilidad celular, lo cual indica la diferencia entre los distintos tipos de lípidos en las células pancreáticas. Nemezc M y col. (65), realizaron un estudio comparando los diferentes efectos de ácido palmítico y ácido oleico en la función de células beta pancreáticas y encontró que células beta tratadas con ácido oleico aumentaron la secreción de insulina y acumulación de lípidos neutrales, mientras que el ácido palmítico no estimulaba la secreción de insulina, y además presentó múltiples efectos negativos tales como generación de ROS, estrés de retículo endoplasmático generado por la sobre regulación de la proteína chaperona BiP y respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés), inflamación y apoptosis por expresión del factor de transcripción *CHOP*, mencionado anteriormente como responsable de la apoptosis en el estrés de retículo endoplasmático.

Por último, cabe señalar las limitantes de este estudio que fueron la utilización de una sola línea celular beta pancreáticas la cual fue MIN6 de origen murino, además de que todos los experimentos se realizaron en un sistema *in vitro* y artificial, lo cual puede tener variaciones en comparación con experimentos *in vivo*. Pero los datos obtenidos son importantes ya que se demostró que el daño citotóxico generado por el palmitato en células beta MIN6 no puede ser combatido solo por activación de la vía Nrf2, y además que la quercetina genera una activación de Nrf2 hasta aproximadamente 80 veces menor que la t-BHQ en la línea celular anteriormente nombrada.

## 8. CONCLUSIONES

En este estudio se concluye que con el sistema *in vitro*, la quercetina disminuye la viabilidad de células MIN6 en un 10% aproximadamente a una concentración mayor o igual a 100  $\mu\text{M}$  y la t-BHQ disminuye el mismo porcentaje a una concentración mayor o igual a 50  $\mu\text{M}$ .

La t-BHQ generó un aumento significativo de la expresión de ARNm de elementos de respuesta antioxidante en células MIN6, lo que comprueba su función activadora de la vía Nrf2 en esta línea celular. Por otro lado, la quercetina no generó un aumento significativo de la expresión de ARNm de los elementos de respuesta antioxidante en células MIN6 en comparación con la t-BHQ, por lo que se infiere que este compuesto no activa significativamente la vía Nrf2 en células MIN6 en contraste con estudios en otras células.

El tratamiento de células MIN6 con palmitato genera una disminución mayor de la viabilidad celular en comparación con el tratamiento con ácido oleico. Y el tratamiento en conjunto con quercetina o t-BHQ no recupera la viabilidad de células MIN6 tratadas con palmitato, por lo tanto, se concluye que la activación de la vía Nrf2 no produce un efecto protector en células MIN6 bajo efecto citotóxico inducido por palmitato, y se postula que esto se debe a otros efectos citotóxicos de este ácido graso saturado a parte del estrés oxidativo, como el estrés de retículo endoplasmático.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):88-98.
2. Lenzen S. Chemistry and biology of reactive species with special reference to the antioxidative defence status in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(8):1929-42.
3. Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med*. 2009;26(12):1185-92.
4. Matzinger M, Fischhuber K, Heiss EH. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? *Biotechnol Adv*. 2018;36(6):1738-67.
5. Tan SM, de Haan JB. Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: how much is too much? *Redox Rep*. 2014;19(3):107-17.
6. Gharavi N, Haggarty S, El-Kadi AO. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr Drug Metab*. 2007;8(1):1-7.
7. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(11):1690-703.
8. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*. 2012;27(4):269-73.
9. Pandey A, Chawla S, Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life*. 2015;67(7):506-13.
10. Schwingshackl L, Hoffmann G, Lampousi AM, Knüppel S, Iqbal K, Schwedhelm C, et al. Food groups and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(5):363-75.
11. Cai H, Li G, Zhang P, Xu D, Chen L. Effect of exercise on the quality of life in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Qual Life Res*. 2017;26(3):515-30.
12. Gutierrez GD, Gromada J, Sussel L. Heterogeneity of the Pancreatic Beta Cell. *Front Genet*. 2017;8:22.
13. Kulkarni RN. The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(3):365-71.
14. Matveyenko AV, Butler PC. Relationship between beta-cell mass and diabetes onset. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10 Suppl 4:23-31.

15. Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9(4):329-43.
16. Velasco M, Larqué C, Díaz-García CM, Sanchez-Soto C, Hiriart M. Rat Pancreatic Beta-Cell Culture. *Methods Mol Biol.* 2018;1727:261-73.
17. Masini M, Martino L, Marselli L, Bugliani M, Boggi U, Filipponi F, et al. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33(6).
18. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1147-50.
19. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1011:168-76.
20. Panigrahy SK, Bhatt R, Kumar A. Reactive oxygen species: sources, consequences and targeted therapy in type 2 diabetes. *J Drug Target.* 2017;25(2):93-101.
21. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):289-98.
22. Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep.* 2014;14(6):492.
23. Wehinger S, Ortiz R, Díaz MI, Aguirre A, Valenzuela M, Llanos P, et al. Phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14 induced by ROS enhances palmitate-induced death of beta-pancreatic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(5):693-708.
24. Rojas J, Bermudez V, Palmar J, Martínez MS, Olivar LC, Nava M, et al. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *J Diabetes Res.* 2018;2018:9601801.
25. Innis SM. Palmitic Acid in Early Human Development. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(12):1952-9.
26. Lopes-Marques M, Delgado IL, Ruivo R, Torres Y, Sainath SB, Rocha E, et al. The Origin and Diversity of Cpt1 Genes in Vertebrate Species. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138447.
27. Ly LD, Xu S, Choi SK, Ha CM, Thoudam T, Cha SK, et al. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med.* 2017;49(2):e291.



28. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(3):178-90.
29. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011;16(2):123-40.
30. Otterbein LE, Foresti R, Motterlini R. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival. *Circ Res.* 2016;118(12):1940-59.
31. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1  $\alpha$  on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274(3):H883-91.
32. Uc A, Zhu X, Wagner BA, Buettner GR, Berg DJ. Heme oxygenase-1 is protective against nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(4):471-6.
33. Chang M, Xue J, Sharma V, Habtezion A. Protective role of hemeoxygenase-1 in gastrointestinal diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(6):1161-73.
34. Ross D, Siegel D. Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ. *Front Physiol.* 2017;8:595.
35. Fu J, Zheng H, Wang H, Yang B, Zhao R, Lu C, et al. Protective Role of Nuclear Factor E2-Related Factor 2 against Acute Oxidative Stress-Induced Pancreatic  $\beta$  -Cell Damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:639191.
36. Nishizono S, Hayami T, Ikeda I, Imaizumi K. Protection against the diabetogenic effect of feeding tert-butylhydroquinone to rats prior to the administration of streptozotocin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000;64(6):1153-8.
37. Ye F, Li X, Li L, Yuan J, Chen J. t-BHQ Provides Protection against Lead Neurotoxicity via Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2075915.
38. Zhang S, Tian M, Li J, Han P, Huang Q, Lyu H. [Influence of tert-butylhydroquinone on the islets function and expression of HO-1 and VEGF in retina of type 2 diabetic rats]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2016;52(5):373-81.
39. Li H, Zhang L, Wang F, Shi Y, Ren Y, Liu Q, et al. Attenuation of glomerular injury in diabetic mice with tert-butylhydroquinone through nuclear factor erythroid 2-related factor 2-dependent antioxidant gene activation. *Am J Nephrol.* 2011;33(4):289-97.

40. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47.
41. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(2-3):67-202.
42. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chem Biol Interact.* 2012;195(2):154-64.
43. Sun GY, Chen Z, Jasmer KJ, Chuang DY, Gu Z, Hannink M, et al. Quercetin Attenuates Inflammatory Responses in BV-2 Microglial Cells: Role of MAPKs on the Nrf2 Pathway and Induction of Heme Oxygenase-1. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141509.
44. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):117-23.
45. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(3):560-8.
46. Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, Bakhiya N, Schäfer B, Hirsch-Ernst KI, et al. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(1).
47. Eid HM, Haddad PS. The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Curr Med Chem.* 2017;24(4):355-64.
48. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;45(2):108-11.
49. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, et al. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology.* 1990;127(1):126-32.
50. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(21):6409-12.
51. Zhang C, Deng Y, Dai H, Zhou W, Tian J, Bing G, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res Bull.* 2017;128:34-9.

52. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 2014;28(3):1317-30.
53. Lv X, Liu T, Ma H, Tian Y, Li L, Li Z, et al. Preparation of Essential Oil-Based Microemulsions for Improving the Solubility, pH Stability, Photostability, and Skin Permeation of Quercetin. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(8):3097-104.
54. Chen R, Lin J, Hong J, Han D, Zhang AD, Lan R, et al. Potential toxicity of quercetin: The repression of mitochondrial copy number. *Toxicol Rep.* 2014;1:450-8.
55. Braeuning A, Vetter S, Orsetti S, Schwarz M. Paradoxical cytotoxicity of tert-butylhydroquinone in vitro: What kills the untreated cells? *Arch Toxicol.* 2012;86(9):1481-7.
56. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004;59(6):566-73.
57. Xu W, Li F, Xu Z, Sun B, Cao J, Liu Y. Tert-butylhydroquinone protects PC12 cells against ferrous sulfate-induced oxidative and inflammatory injury via the Nrf2/ARE pathway. *Chem Biol Interact.* 2017;273:28-36.
58. Lee YJ, Beak SY, Choi I, Sung JS. Quercetin and its metabolites protect hepatocytes against ethanol-induced oxidative stress by activation of Nrf2 and AP-1. *Food Sci Biotechnol.* 2018;27(3):809-17.
59. Bahar E, Kim JY, Yoon H. Quercetin Attenuates Manganese-Induced Neuroinflammation by Alleviating Oxidative Stress through Regulation of Apoptosis, iNOS/NF- $\kappa$ B and HO-1/Nrf2 Pathways. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
60. Raja SB, Rajendiran V, Kasinathan NK, P A, Venkatabalasubramanian S, Murali MR, et al. Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. *Food Chem Toxicol.* 2017;106(Pt A):92-106.
61. Mutlu Altundağ E, Yılmaz AM, Koçtürk S, Taga Y, Yalçın AS. Synergistic Induction of Apoptosis by Quercetin and Curcumin in Chronic Myeloid Leukemia (K562) Cells. *Nutr Cancer.* 2018;70(1):97-108.
62. Carrasco-Pozo C, Tan KN, Reyes-Farias M, De La Jara N, Ngo ST, Garcia-Diaz DF, et al. The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial

bioenergetics of pancreatic  $\beta$ -cells, glycemic control and inflammation: In vitro and in vivo studies. *Redox Biol.* 2016;9:229-43.

63. Yin J, Wang Y, Gu L, Fan N, Ma Y, Peng Y. Palmitate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in mature adipocytes: implications for apoptosis and inflammation. *Int J Mol Med.* 2015;35(4):932-40.

64. Hu M, Yang S, Yang L, Cheng Y, Zhang H. Interleukin-22 Alleviated Palmitate-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in INS-1 Cells through Activation of Autophagy. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146818.

65. Nemezc M, Constantin A, Dumitrescu M, Alexandru N, Filippi A, Tanko G, et al. The Distinct Effects of Palmitic and Oleic Acid on Pancreatic Beta Cell Function: The Elucidation of Associated Mechanisms and Effector Molecules. *Front Pharmacol.* 2018;9:1554.

